

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

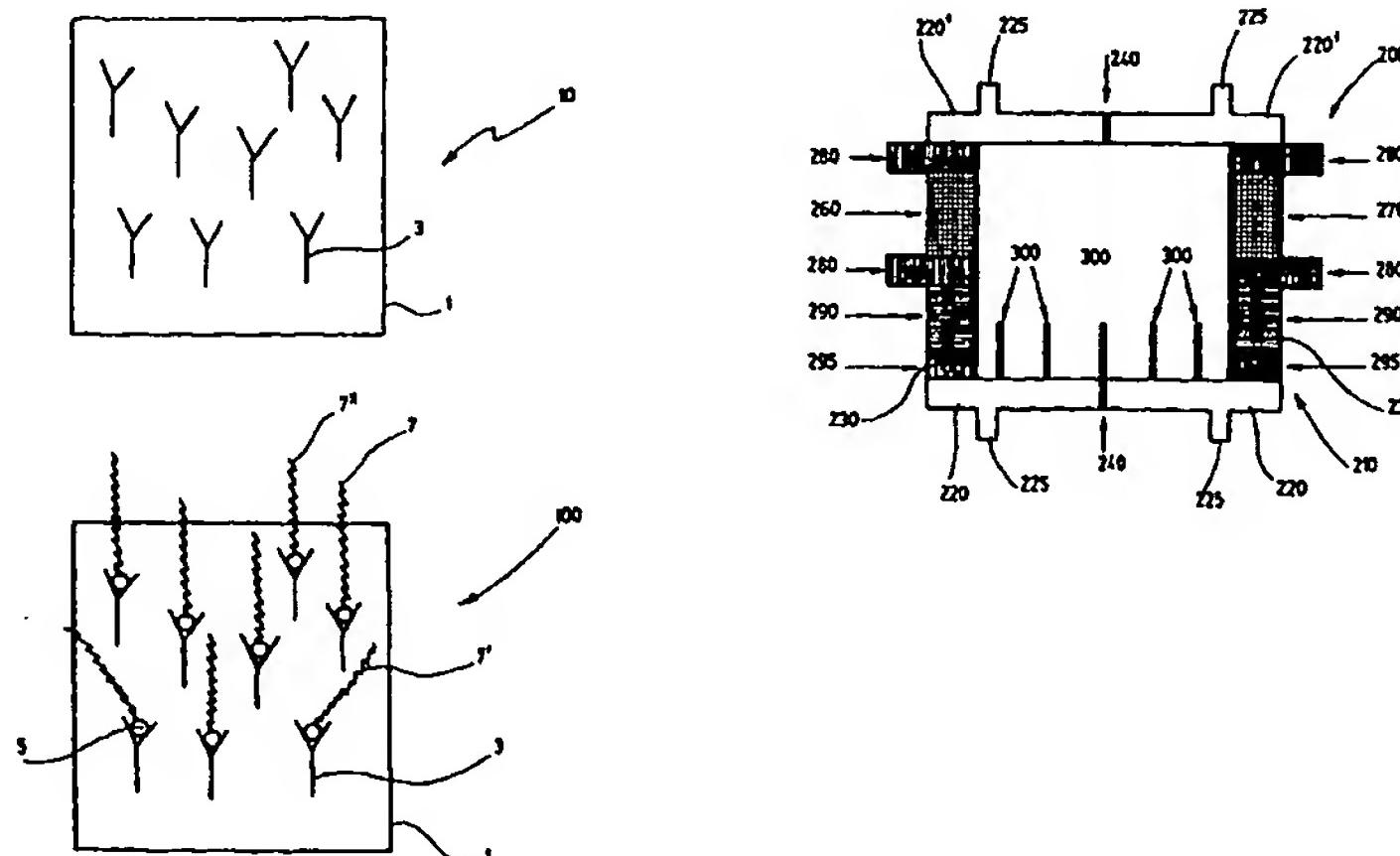


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12Q 1/68, C12N 15/10, G01N 1/34		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57314 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03047 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 1999 (04.05.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 19 889.2 4. Mai 1998 (04.05.98) DE 199 06 277.3 15. Februar 1999 (15.02.99) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 59, D-80636 München (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, D-72074 Tübingen (DE). BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der Betteleiche 6, D-70569 Stuttgart (DE). VITZTHUM, Frank [DE/DE]; Zeppelinstrasse 40, D-71157 Hildrizhausen (DE). ELKINE, Bentsian [-/DE]; Kaiserstrasse 8, D-70599 Stuttgart (DE). GEIGER, Georg [DE/DE]; Gabelsbergerstrasse 39, D-75175 Pforzheim (DE). TOVAR, Günter [DE/DE]; Oberer Grundweg 25, D-70563 Stuttgart (DE).			
(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).			

(54) Title: ELECTRICAL INTEGRATED NUCLEIC ACID ISOLATION, PURIFICATION AND DETECTION

(54) Bezeichnung: ELEKTRISCHE, INTEGRIERTE NUCLEINSÄUREISOLIERUNG, -REINIGUNG UND -DETEKTION



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasiliens	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Elektrische, integrierte Nucleinsäureisolierung,
-reinigung und -detektion

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere einem biotischen oder abiotischen Material.

Die spezifische oder quantitative Isolierung von Nucleinsäuren aus bestimmten Ausgangsmaterialien spielt in einer Vielzahl von wissenschaftlichen, industriellen oder sonstigen Bereichen eine große Rolle. Derartige Bereiche sind zum Beispiel die Umweltanalytik, Kriminaltechnik, Grundlagenforschung, Lebensmitteldiagnostik, Veterinärdiagnostik, Epidemiologie, Tumordiagnostik, Erbgutanalyse, Analyse von Erbkrankheiten und Infektionskrankheiten, Monitoring von Krankheiten, Therapie von Krankheiten, Früherkennung von Multiple-Drug-resistanten Keimen, Bodenuntersuchungen, Suche und Entwicklung von Pharmaka und Impfstoffen, Agrotechnik oder ähnliches. Ebenso vielfältig wie die Anwendungsbereiche können die Ausgangsmaterialien für die Isolierung der Nucleinsäuren sein, beispielsweise eukaryotische oder prokaryotische Zellen oder deren Homogenate, Bodenproben, Blutproben, Körperflüssigkeiten oder Gewebehomogenate. In Abhängigkeit von diesem Ausgangs- oder Probenmaterial müssen unterschiedliche Aufschlußverfahren eingesetzt werden, um die beispielsweise in Zellen und/oder Zellkernen

BESTÄTIGUNGSKOPIE

- 2 -

vorhandenen Nucleinsäuren einer Isolierung zugänglich zu machen. Häufig eingesetzte Aufschlußverfahren sind zum Beispiel die Ultraschall- und/oder Enzymbehandlung. Nach Durchführung der Aufschlußbehandlung werden die Nucleinsäuren beispielsweise mittels Gelelektrophorese, Ultrazentrifugation oder Affinitätschromatographie isoliert.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren wie Enzym-Immuno-Assays (EIA), Zellkulturen und Tierversuchen liefern genetische Untersuchungen über eine entsprechende Nucleinsäurediagnostik recht schnell empfindlichere und spezifischere Aussagen, so daß Kosten reduziert werden können. Die Nucleinsäurediagnostik basiert auf der Nucleinsäureisolierung, das heißt der Probenvorbereitung zur Freisetzung von Nucleinsäuren aus biologischem Material, der Nucleinsäurereinigung, deren Nachweis und der anschließenden Auswertung siehe zum Beispiel Lichtensteiger et al., J. Clin. Microbiol. 34 (1996), 3035 bis 3039.

Die für eine Nucleinsäurediagnostik einsetzbare Affinitätschromatographie beruht im wesentlichen auf der Fähigkeit von Nucleinsäuren, reversibel an positiv geladene und/oder positivpolare Matrizes zu binden. In der Regel wird zunächst eine anionische oder polare Bindung der Nucleinsäuren an die Matrix erwirkt und anschließend die Nucleinsäure durch Einsatz geeigneter Lösemittel von Verunreinigungen befreit. In einem zweiten Schritt wird die an die Matrix gebundene Nucleinsäure unter Einsatz eines weiteren Lösemittels, beispielsweise mit höherer Ionenstärke, von der Matrix gelöst. Anschließend

muß die so isolierte Nucleinsäure im allgemeinen wieder deionisiert werden, um für weitere Untersuchungen verwendet werden zu können.

Als nachteilig erweist sich dabei, daß je nach eingesetztem Probenmaterial und durchgeföhrtem Aufschlußverfahren unterschiedliche Isolierungsstrategien entwickelt und eingesetzt werden müssen. Zudem ist es nicht möglich, Probenaufschluß und Nucleinsäureisolierung beziehungsweise -reinigung in einem Verfahrensgang vorzunehmen.

Sowohl DNA als auch RNA wird herkömmlicherweise auch mittels Ultrazentrifugation isoliert, wobei häufig Protease- und Phenolbehandlungen durchgeführt werden müssen. Diese Verfahrensweise weist den Nachteil auf, daß insbesondere hochmolekulare DNA selbst nach Durchführung der Isolierung häufig noch mit Proteinen verunreinigt sind und die Moleküle aufgrund der einwirkenden Scherkräfte der Gefahr des Zerbrechens ausgesetzt sind. Zudem ist die Phenolbehandlung gesundheits- und umweltschädlich.

Eine weitere Methode basiert auf der Bindung von Nucleinsäuren an Silicamaterialien unter Hochsalzbedingungen, wie 6 M GdnSCN, welches zuvor dann auch als Zellaufschlußagens diente. Der Einsatz von solchen Stoffen ist jetzt wegen deren Giftigkeit, Viskosität und Hemmung nachfolgender Prozesse wie der PCR nachteilig.

Auch die zur Nucleinsäureisolierung oftmals eingesetzte Gelelektrophorese weist unter anderem aufgrund der notwendigen vergleichsweise umständlichen

Vor- und Nachbehandlung der Proben beziehungsweise Nucleinsäuren Nachteile auf.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem liegt also darin, ein kostengünstiges und einfach durchzuführendes Zellaufschluß- und Isolierungsverfahren für Nucleinsäuren bereitzustellen, das aus beliebigem biotischem und/oder abiotischem Probenmaterial bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren in besonders reiner Form bereitstellt. Dieses Verfahren soll grundsätzlich in der Lage sein, sowohl quantitativ Nucleinsäuren als Substanzklasse aus vielen verschiedenen Einzelindividuen als auch spezifisch ganz konkrete Nucleinsäuresequenzen isolieren und reinigen zu können.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei die Probe unter dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen wird und die freigesetzten Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß zumindest ein Teil der Nucleinsäure an das nucleinsäureaffine Material binden kann. Die Erfindung betrifft insbesondere ein vorgenanntes Verfahren, wobei ein frei beziehungsweise ungebunden vorliegendes oder immobilisiertes nucleinsäureaffines Material mit der Probe nach deren elektrisch bewirkten Aufschluß so in Kontakt gebracht wird, daß eine Bindung beziehungsweise Hybridisierung von in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material stattfinden kann und wobei gegebenenfalls die

gebundenen Nucleinsäuren nach einem gegebenenfalls erfolgenden Waschschnitt von dem nucleinsäureaffinen Material abgelöst und zum Beispiel amplifiziert, nachgewiesen oder sonstwie verwendet werden können. Dabei kann „affin“ auch die Bindung von Nucleinsäuren an positive geladene Materialien bedeuten.

Die Erfindung stellt also ein affinitätschromatographisches Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren bereit, bei dem in einer Probe enthaltene Nucleinsäuren nach Aufschluß der Probe mittels mindestens eines elektrischen Feldes mit einem nucleinsäureaffinen Material in Kontakt gebracht werden und dieses nucleinsäureaffine Material spezifisch einzelne, mehrere oder alle beziehungsweise im wesentlichen alle in der Probe enthaltenen Nucleinsäuren, zum Beispiel DNA oder RNA, bindet und damit von den anderen Probenbestandteilen wie Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten oder gegebenenfalls nicht interessierenden Nucleinsäuren etc. isoliert. Die dabei einzuhaltenden Hybridisierungsbedingungen wie Temperatur und Pufferzusammensetzung und/oder die elektrischen Parameter des Feldes wie Impulszahl, Impulsfrequenz oder Feldstärke hängen von der jeweiligen konkreten Isolieraufgabe ab.

Die Erfindung stellt in vorteilhafterweise also ein einstufiges Verfahren bereit, wobei im Rahmen eines einzigen Verfahrensschrittes eine Probe unter dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen und gleichzeitig oder anschließend die freigesetzten und ursprünglich in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß je nach

eingesetztem Nucleinsäureaffinen Material entweder quantitativ alle oder im wesentlichen alle Nucleinsäuren oder aber nur einzelne Nucleinsäuregruppen beziehungsweise einzelne spezifische Nucleinsäuresequenzen abgetrennt werden können.

Die Erfindung ermöglicht eine universell einsetzbare, standardisierbare und automatisierbare Nucleinsäurediagnostik zur Gen- und Genomanalyse mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise weist eine hohe Schnelligkeit auf, wobei der einzusetzende Materialaufwand gering und der Einsatz kostenintensiver und giftiger Substanzen minimiert ist. Schließlich ist das Risiko von Querkontaminationen vermindert, so daß die Empfindlichkeit des Verfahrens groß ist. Zudem läßt sich das Verfahren kostengünstig realisieren. Das erfindungsgemäße Verfahren weist ferner den Vorteil auf, daß bei der Nucleinsäureisolierung und -reinigung ein derart hoher Reinigungsgrad der Nucleinsäuren erreicht wird, daß anschließend eine Amplifikation von Nucleinsäuren ohne Störung durch Amplifikationsinhibitoren und Querkontaminationen möglich ist, die zur falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnissen führen würde. So kann zum Beispiel der elektrische Zellaufschluß gänzlich ohne Zugabe von chemischen Aufschlußreagenzien, die wiederum stören könnten, erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die Probe dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes konstanter Spannung oder eines gepulsten elektrischen Feldes zur Freisetzung der Nucleinsäuren und/oder Lyse der biologischen

Probe auszusetzen. Durch die Einwirkung des elektrischen Feldes und den elektrischen Durchbruch entstehen in den Lipidschichten, aus denen die Zellmembran besteht, Poren. Im Rahmen des Einsatzes gepulster elektrischer Felder kann eine Elektroporation und eine osmotische Lyse von Zellen kombiniert werden, so daß die in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren vollständig freigesetzt und auch gereinigt werden können. Geeignete Parameter für gepulste elektrische Felder sind zum Beispiel in Kinosita und Tsong, Nature 268 (1977), 438 bis 441, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 1923 bis 1927 oder Benz und Zimmermann, Bioelektrochem. Bioenerg. 7 (1988), 723 bis 739 beschrieben, die insoweit in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß es sich bei dem hier beschriebenen Verfahren nicht um die Elektroporation handelt, die bekannt ist, sondern um den umgekehrten Vorgang des Nucleinsäureaustritts. Erfindungsgemäß können Feldstärken von 0,5 bis 50, vorzugsweise 5 bis 30 kV/cm, und Pulslängen beziehungsweise Zeitkonstanten von ca. 0,5 μ s bis 50 ms sowie zum Beispiel 1 bis 1000000, vorzugsweise 1000 bis 10000 Impulse, eingesetzt werden. Selbstverständlich können jedoch auch erheblich davon abweichende elektrische Parameter eingesetzt werden. Die Impulsform kann zum Beispiel rechteckig, exponentiell abnehmend oder sinusartig, vorzugsweise im Radiofrequenzbereich, sein. Das elektrische Feld kann dabei sowohl durch Wechsel- als auch Gleichspannung erzeugt werden. Übliche elektrische Parameter sind zum Beispiel auch in den US-PS 5,447,733; US-PS 5,235,905 oder US-PS 5,393,541 beschrieben, die insofern in den vorlie-

genden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Die einzusetzenden Feldstärken liegen bevorzugt über der kritischen Spannung V_c über der Membran des biologischen Materials. Weitere geeignete Bedingungen sind beispielsweise in Vitztum et al., FEBS Abstracts, 155 (1998) beschrieben, das insoweit ebenfalls in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen ist. Bei der Verwendung von gepulsten elektrischen Feldern zur Nucleinsäureisolierung ist es beispielsweise erfundungsgemäß möglich, über die Wahl der Behandlungsparameter nur bestimmte Zelltypen in einer Suspension verschiedener Zelltypen, also der eingesetzten Probe, zu lysieren. Dadurch können bestimmte Nucleinsäuren eines Zelltyps von Nucleinsäuren eines anderen Zelltyps abgetrennt werden. Zudem kann durch den Einsatz gepulster elektrischer Felder eine selektive Freisetzung von Nucleinsäuren aus Zellen eines Zelltyps durch Wahl der geeigneten Bedingungen bewirkt werden, wobei der entstehende chromatographische Effekt zu einer Kombination einer Nucleinsäureisolierung mit einer Nucleinsäurereinigung führt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird für den Zellaufschluß ein elektrisches Feld mit konstanter Spannung eingesetzt, unter Bedingungen wie sie beispielsweise in Pollard-Knight et al. WO 97/41219 (1997) beschrieben sind, das insofern in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen ist.

Während des Probenaufschlusses können mit Hilfe der elektrischen Felder durch Zellfusion auch Substanzen in die Zellen oder Micellen eingebracht werden,

die später die Lyse und/oder Nucleinsäurefreisetzung unterstützen, spezifizieren oder der Markierung für eine spätere Detektion dienen.

Selbstverständlich ist es erfindungsgemäß auch bevorzugt, mehrere gleiche oder verschiedene elektrische Felder gleichzeitig oder nacheinander auf die Probe einwirken zu lassen.

Es ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, den Zellaufschluß durch den Einsatz hoher Temperaturen, zum Beispiel von 30°C bis 95°C, zu unterstützen.

Selbstverständlich ist es auch möglich, den Probenaufschluß mit anderen Parametern des elektrischen Feldes durchzuführen und/oder gegebenenfalls chemische Agenzien, zum Beispiel chaotrope Substanzen oder Detergenzien, zusätzlich vorzusehen, die den Zellaufschluß unterstützen, zum Beispiel SDS, Lipasen, Proteasen wie die Proteinase K oder DMSO (Dimethylsulfoxid), Harnstoff, Guanidiniumthiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid.

Bevorzugt ist es jedoch, das erfindungsgemäße Verfahren ohne Zusatz chemischer Substanzen, zum Beispiel ausschließlich in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Pufferlösung durchzuführen.

Tatsächlich liegt ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung nämlich darin, für den Zellaufschluß keine chaotropen Reagenzien oder Detergenzien einsetzen zu müssen, sondern den Zellaufschluß in physiologischer Lösung, Pufferlösung oder Wasser durchführen zu können.

In besonders vorteilhafter Weise kann vorgesehen sein, die mit dem immobilisierten oder freien nucleinsäureaffinen Material in Kontakt gebrachte Probe Ultraschalleinfluß in Kombination mit der elektrischen Behandlung, zum Beispiel durch elektrische Funkenentladung wie beschrieben in US 5,368,724, auszusetzen, um einen Probenaufschluß, insbesondere Zellaufschluß, zu unterstützen. Dies führt gleichzeitig zu einer Erwärmung des Reaktionsgemisches aus Probe und nucleinsäureaffinem Material, so daß die in der Probe enthaltende DNA denaturiert wird und beim Abkühlen an die immobilisierte DNA-Mischung binden kann. Zusätzlich findet eine gegebenenfalls vorteilhafte Fragmentierung der Nucleinsäure statt. Die Ultraschallbehandlung unterstützt also den Probenaufschluß und/oder die Bindung der Nucleinsäure an das nucleinsäureaffine Material.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt vorgesehen, nicht nur den Zellaufschluß, sondern auch die Bindung der freigesetzten Nucleinsäuren an das frei oder immobilisiert vorliegende nucleinsäureaffine Material unter Einsatz eines elektrischen Feldes durchzuführen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß während des Inkontaktbringens der freigesetzten Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material mindestens ein elektrisches Feld, zum Beispiel ein oder mehrere gepulste elektrische Felder und/oder eine oder mehrere Felder konstanter Spannung eingesetzt werden,

um so eine Elektrohybridisierung zu bewirken. Die Elektrohybridisierung begünstigt die Hybridisierung beziehungsweise Bindung oder Adsorption der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material und kann die Spezifität der Bindung verbessern. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die freigesetzten elektrisch negativ geladenen Nucleinsäuren unter Anlegen einer elektrischen Spannung zunächst im Bereich der Anode einer für die Durchführung des Verfahrens eingesetzten Probekammer anzureichern, wobei beispielsweise vorteilhafterweise vorgesehen sein kann, im Anodenbereich immobilisiertes nucleinsäureaffines Material vorzusehen, so daß im Bereich dieses nucleinsäureaffinen Materials eine lokal hohe Nucleinsäurekonzentration auftritt, die eine Adsorption beziehungsweise Hybridisierung kinetisch und thermodynamisch begünstigt. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, während des Anliegens des elektrischen Feldes beim Inkontaktbringen der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material ein Umpolen des elektrischen Feldes vorzunehmen, so daß aufgrund der veränderten kinetischen und thermodynamischen Bedingungen im Kathodenbereich elektrostringent gewaschen werden kann.

Sofern freie nucleinsäureaffine Materialien, zum Beispiel ungebundene Zufallssequenzen eingesetzt werden, können bei Anlegen eines elektrischen Feldes konstanter Spannung oder eines gepulsten elektrischen Feldes im Rahmen der erfindungsgemäß vorgesehenen Elektrohybridisierung die elektrophoretischen Effekte, die sich bei der Wanderung der negativ geladenen Nucleinsäuren mit dem vorzugsweise

- 12 -

auch negativ geladenen nucleinsäureaffinen Material einstellen, ausgenützt werden.

Liegt das nucleinsäureaffine Material erfindungsgemäß also frei während des Probenaufschlusses vor, muß es vorzugsweise eine negative Nettoladung besitzen, um über elektrophoretische Effekte die Nucleinsäurereinigung zu unterstützen. Im elektrischen Feld, vorzugsweise in einem inhomogenen elektrischen Feld, wandert das nucleinsäureaffine Material und die freigesetzten Nucleinsäuren in dieselbe Richtung zur Anode hin, so daß sich deren Konzentration dort lokal erhöht. Neben der Abtrennung von Substanzen anderer elektrischer Eigenschaften hat dies den Vorteil, daß die Assoziation von nucleinsäureaffinen Material und Nucleinsäure kinetisch und thermodynamisch begünstigt wird.

Liegt das nucleinsäureaffine Material immobilisiert, zum Beispiel an den Probenträger gebunden vor, kann erfindungsgemäß eine Elektrohybridisierung durchgeführt werden. Außerdem kann während oder nach der Elektrohybridisierung ein elektrostringentes Waschen und eine Elektroelution durchgeführt werden, wie sie beispielsweise in Hintsche, Medizinische Genetik 11 (1999), 12 bis 13, Cheng et al., Anal. Chem. 70 (1998), 2321 bis 2326, Cheng et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998), 541 bis 546, DE 196 281 71 und US 5,632,957 beschrieben sind, die insofern in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Selbstverständlich kann auch im Fall der Verwendung von freiem, nucleinsäureaffinen Material gegebenenfalls ein

- 13 -

elektrostringentes Waschen und eine Elektroelution vorgesehen sein.

Die Erfindung sieht also in bevorzugter Ausführungsform vor, daß sowohl während des Probenaufschlußes als auch während des gleichzeitig oder darauffolgend stattfindenden Inkontaktbringens des nucleinsäureaffinen Materials mit den Nucleinsäuren ein oder mehrere elektrische Felder, die gegebenenfalls umgepolt werden, eingesetzt werden, um so eine Freisetzung der Nucleinsäuren und eine selektive Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material zu ermöglichen. Gegebenenfalls kann durch den Einsatz des elektrischen Feldes auch ein Waschen der gebundenen Nucleinsäuren stattfinden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß auch der nachfolgende Nachweisschritt der aufgereinigten Nucleinsäuren mittels eines elektrischen Feldes durch elektrische Detektion stattfindet. Dabei kann verfahren werden, wie in Hintsche, Medizinische Genetik 11, (1999) 12 bis 13 beschrieben. Der Nachweis kann jedoch auch mittels herkömmlicher optischer, spektrophotometrischer, luminometrischer oder radioaktiver Verfahrensweisen erfolgen.

Die nucleinsäureaffinen Materialien können entweder frei in Lösung oder an eine Matrix, zum Beispiel einen Probenträger oder die Elektroden selbst immobilisiert vorliegen. Als Matrix kann zum Beispiel auch eine Elektrode oder ein Wandbereich aus nicht leitendem Material einer Probenkammer dienen.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, daß nach Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material die restliche Probe von den an das nucleinsäureaffine Material gebundenen Nucleinsäuren abgetrennt und die isolierten Nucleinsäuren in bevorzugter Ausführungsform gewaschen werden, zum Beispiel ebenfalls unter Einsatz eines elektrischen Feldes, das heißt es wird ein elektrostringentes Waschen durchgeführt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, daß nach der Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material entweder vor oder nach der Abtrennung der restlichen Probe ein Nachweis der gebundenen Nucleinsäure, gegebenenfalls nach vorheriger Amplifikation beispielsweise mittels PCR, durchgeführt wird, insbesondere optisch zum Beispiel luminometrisch oder spektrophotometrisch, radioaktiv oder elektrisch.

In besonders bevorzugter Ausführungsform ist es möglich, den Probenaufschluß, die Probenaufreinigung und den Nachweis in einem einstufigen Verfahren in ein und demselben Probenträger durchzuführen, wobei vorzugsweise während des gesamten Prozesses ein elektrisches Feld angelegt beziehungsweise zu bestimmten Zeiten zugeschaltet wird, welches den Probenaufschluß, die Nucleinsäureaufreinigung und die Detektion gewährleistet. Die gegebenenfalls durchgeführte Amplifikation der nachzuweisenden Nucleinsäuren kann erfindungsgemäß eine elektrische isotherme Amplifikation sein, wie sie in WO 98/02573, WO 93/15224 oder WO 95/25177 be-

schrieben ist und die insoweit in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind.

Die Erfindung stellt also ein Verfahren zur Verfügung, gemäß dem die Nucleinsäureisolierung aus einer Probe, die Nucleinsäurereinigung durch Bindung an nucleinsäureaffines Material, gegebenenfalls das Waschen der isolierten Nucleinsäuren und der Nachweis in einem einstufigen Verfahren unter Einsatz mindestens eines elektrischen Feldes durchgeführt wird. Die dadurch erzielte Integration ermöglicht die Grundlage für ein Produkt, das heißt eine Vorrichtung, mittels derer alle vorgenannten Schritte in einem Arbeitsgang in einer Probenkammer durchgeführt werden können, das heißt, dadurch wird die Nucleinsäurediagnostik erheblich beschleunigt, die Gefahr von Querkontaminationen vermindert, die Empfindlichkeit und Spezifität gesteigert sowie eine Automatisierung auch im Chipmaßstab, also im mm-Bereich ermöglicht.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Probe jedes beliebige organische, anorganische oder biotisch/abiotische Material verstanden, sofern dieses eine Nucleinsäure, also DNA oder RNA, enthält. Eine Probe kann demgemäß eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle oder ein Zellhomogenat, ein Virus, zum Beispiel enthalten in einer Virussuspension, Blut, Sperma, Lymph- oder sonstige Körperflüssigkeit, Organ- oder Gewebepräparat, Wasser- oder Bodenproben, Liposomen, Zellorganelle, Zellkern, Hefe, Pflanzenhomogenate, Bernstein oder sonstiges sein. Die Probe weist vorzugsweise

Wasser oder eine physiologische Salzlösung oder Pufferlösung als Lösungsmittel auf.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter Probenaufschluß die möglichst vollständige Freisetzung von Nucleinsäuren, gegebenenfalls die Sequenz- und/oder Kompartiment-selektive Freisetzung von Nucleinsäuren aus einem biologischen Material, einer Probe also, verstanden, die mit Zerstörung der Probe, zum Beispiel Lyse, oder reversibler Schädigung der Probe, zum Beispiel Porenbildung einhergehen kann.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem nucleinsäureaffinen Material ein Material verstanden, das in der Lage ist, Nucleinsäuren, vorzugsweise reversibel, zu binden. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist das nucleinsäureaffine Material ein Material, das hinsichtlich der konkreten Nucleinsäuresequenz unspezifisch alle oder im wesentlichen alle Nucleinsäuren einer Probe bindet, zum Beispiel Silica, Diatomeen oder Anionentauscher. Auch nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Gemische, Proteine, Kohlenhydrate, Glycoproteine oder Proteoglycane sind Materialien, die quantitativ Nucleinsäuren binden, also nucleinsäureaffine Materialien im Sinne der Erfindung. Selbstverständlich wird unter einem nucleinsäureaffinen Material auch Material verstanden, das nur bestimmte Nucleinsäuren bindet, das heißt eine Nucleinsäurespezifität aufweist, wie beispielsweise fragmentierte Zielgenome. Unter nucleinsäureaffinen Material wird jedoch auch eine höchst sequenzspezifische Nucleinsäure verstanden,

die ganz spezifisch nur ein konkretes Nucleinsäure-spezies aus einer viele Nucleinsäurespezies enthaltenen Probe isoliert und bindet, zum Beispiel eine bestimmte cDNA oder genomische DNA-Sequenz. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung sind die nucleinsäureaffinen Materialien zum Beispiel Zufallsoligonucleotide oder sequenzspezifische Oligonucleotiden von zum Beispiel 7 bis 50 Nucleotiden Länge.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung eine Mischung aus DNA-Zufallssequenzen, die auch als random primer bezeichnet werden, verstanden, die nicht spezifisch auf eine konkret zu isolierende Nucleinsäure zusammengestellt ist, sondern jede beliebige Nucleotidpermutation aufweist, so daß unterschiedslos alle in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren mit für eine Hybridisierung ausreichende Kettenlänge gebunden werden. Die DNA-Zufallssequenzen weisen eine im wesentlichen einheitliche, aber beliebige Kettenlänge auf, vorzugsweise eine durchschnittliche Kettenlänge von 15 bis 30. Die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung weist also eine Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Molekülen in Einzelstrangform auf, deren Sequenz jeweils zufallsgemäß zusammengesetzt ist.

Bei der Herstellung dieser DNA-Mischung wird so vorgegangen, daß im Verlauf der DNA-Synthese die vier am DNA-Aufbau beteiligten Nucleoside, das heißt Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin sowie gegebenenfalls deren je-

weilige Synthone, das heißt deren strukturanaloge Modifikationen, pro DNA-Kettenverlängerungsschritt in einem Mischungsverhältnis von 1:1:1:1 eingesetzt werden. Das hat zur Folge, daß je Position in einer DNA-Molekülkette alle vier Nucleoside mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingebaut werden. Eine DNA-Mischung mit DNA-Zufallssequenzen von jeweils beispielsweise 20 Nucleotiden Länge, dargestellt durch die Abfolge 5' (N)₂₀ 3', wobei N für Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxythymidin und Desoxycytidin steht, repräsentiert demnach eine Mischung aller einzelsträngiger DNA-Moleküle mit einer Kettenlänge von 20 Nucleotiden, das heißt 4^{20} verschiedene DNA-Moleküle. Die Anzahl von unterschiedlichen DNA-Zufallsequenzen pro erfindungsgemäßer DNA-Mischung beträgt demnach 4^x , wobei x die Kettenlänge oder Nucleotidanzahl der DNA-Zufallssequenz ist.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung betrifft die Erfindung ein vorgenanntes Verfahren, wobei die in der DNA-Mischung vorhandenen 4^x Zufallssequenzen in gleichen, vorzugsweise in im wesentlichen, molaren Mengenanteilen vorkommen. Die erfindungsgemäß eingesetzte DNA-Mischung ist also nicht im Hinblick auf eine konkrete Isolieraufgabe hin entwickelt, sondern stellt vielmehr eine für jede beliebige DNA- oder RNA-Isolieraufgabe einsetzbare DNA-Mischung ohne jegliche konkrete DNA- oder RNA-Spezifität dar. Die eingesetzte DNA-Mischung ist nur insoweit spezifisch, als daß sie Nucleinsäuren, das heißt DNA oder RNA, von anderen Stoffen wie zum Beispiel Proteinen, Zuckern oder ähnlichem trennen kann. Erfindungsgemäß kann jedoch vorgesehen sein, durch geeignete Auswahl der Binde-

beziehungsweise Hybridisierungsbedingungen zwischen zu isolierender Nucleinsäure und nucleinsäureaffinen Material oder der Lösebedingungen (Temperatur, Ionenstärke etc.) DNA von RNA zu unterscheiden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann also in vorteilhafter Weise DNA- oder RNA-spezifisch durchgeführt werden.

Selbstverständlich kann die erfindungsgemäß einzusetzende DNA-Mischung aus Zufallssequenzen oder spezifischen Oligonucleotiden auch andere Nucleoside wie Desoxyinosin, Uridin, Pseudouridin, N²-Dimethyl-guanosin, N⁶-Isopentenyladenosin, also Synthone, enthalten. Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, anstelle der Desoxypentosen, Pentosen, also RNA-Bausteine, einzusetzen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer DNA-Mischung gegebenenfalls also auch eine RNA-Mischung verstanden.

Erfindungsgemäß können insbesondere Oligonucleotide als nucleinsäureaffines Material eingesetzt werden, wobei sowohl hochspezifische Sonden aber auch unspezifischere Oligonucleotide, wie fragmentierte Zielgenome oder Zufallsoligonucleotide, das heißt nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischungen, sogenannte Random-Oligonucleotide eingesetzt werden können. Die Verwendung von Random-Oligonucleotiden als nucleinsäureaffines Material bietet gegenüber Materialien wie Anionentauschern und Silica, die erfindungsgemäß auch eingesetzt werden können, den Vorteil einer geringeren Affinität gegenüber anderen Polyanionen als Nucleinsäuren und einer höheren Affinität zu den Nucleinsäuren aufgrund des Prinzip

der komplementären Basenpaarung im Vergleich zu Materialien wie Silica oder Anionenaustauschern, sie sind aber im Vergleich zu Oligonucleotiden mit spezifischen Sequenzen zur Reinigung verschiedener unterschiedlicher Nucleinsäuren geeignet. Die Kopp lung der Oligonucleotide an den Träger oder die Matrix erfolgt vorzugsweise über das 3'-Ende des Oligonucleotids, so daß bei einer gegebenenfalls erfolgenden Amplifikation, beispielsweise mittels PCR, keine Nebenprodukte entstehen können. Bei Verwendung spezifischer Oligonucleotide ist es erfindungsgemäß bevorzugt, Schmelztemperaturen unterhalb derer der PCR-Primer zu wählen, um Kompetitionen zu minimieren.

Neben der bevorzugten Verwendung von DNA-Oligonucleotiden ist der Einsatz von RNA-Oligonucleotiden und Peptide Nucleic Acids (PNAs) erfindungsgemäß möglich. Des weiteren ist es erfindungsgemäß bevorzugt, modifizierte Basen einzusetzen, um bestimmte Hybridisierungseffekte zu erzielen. Auch der Einsatz von speziellen Zuckern im Zusammenhang mit Nucleinsäureoligonucleotiden, wie beispielsweise in Beier et al., Science 283 (1999), 699 bis 703 beschrieben, ist erfindungsgemäß vorgesehen und insofern in den vorliegenden Offenba rungsgehalt mit einbezogen.

Die Erfindung weist den Vorteil auf, daß aus einer Probe bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren isoliert werden können und in reiner Form erhalten werden, so daß diese direkt für andere Analyse- oder Präparationsschritte, wie beispielsweise ein

PCR-Verfahren, eingesetzt werden können. Die erfindungsgemäße Vorgehensweise setzt in vorteilhafter Weise keine kosten- und zeitintensiven Anpassungsschritte des Verfahrens an die jeweilige Isolieraufgabe voraus. Vielmehr kann das erfindungsgemäße Verfahren direkt ohne weitere Modifikation für jede beliebige Isolieraufgabe eingesetzt werden.

In besonders bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß nach der Affinitätsbindung der in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material Verunreinigungen mittels geeigneter Pufferlösungen oder Wasser entfernt werden. Nach dem erfolgten Waschschritt kann die affinitätsgebundene Nucleinsäure durch Erhöhung der Umgebungstemperatur, beispielsweise auf mindestens 70°C, zum Beispiel Siedetemperatur, in Gegenwart eines geeigneten Lösemittels, zum Beispiel einer Pufferlösung oder Wasser, von dem nucleinsäureaffinen Material abgelöst werden. Die Ablösung kann auch durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösepuffers oder eine Veränderung des pH-Wertes oder durch elektrisches Waschen erfolgen. Die erhaltene Nucleinsäure ist frei von Verunreinigungen und kann insbesondere durch PCR-Verfahren, auch in Gegenwart der gegebenenfalls immobilisierten DNA-Mischung, amplifiziert werden.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform eine Vorrichtung zur Isolierung und Prozessierung von Nucleinsäuren, insbesondere zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, wobei die Vorrichtung, im folgenden auch als Probenträger bezeichnet, mindestens eine Probenkammer mit minde-

stens zwei flächig ausgebildeten Elektroden und mindestens einem nichtleitenden Rahmenteil umfaßt, und wobei die mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden und das mindestens eine Rahmenteil als Wand-, Deckel- oder Bodenteil der Probenkammer ausgeführt sind. Die erfindungsgemäße Probenkammer weist also eine von Bodenteil, Wandteil oder Wandteilen sowie gegebenenfalls Deckelteil umschlossene im Querschnitt kreisförmige oder rechteckige Kammer auf, wobei Bereiche der Wand-, Boden- und/oder Deckenteile als flächig ausgebildete Elektroden ausgeführt sind. Die erfindungsgemäß vorgesehenen vorzugsweise gegenüberliegend angeordneten mindestens zwei Elektroden weisen elektrische Anschlüsse auf und dienen der Erzeugung eines Probenaufschluß und gegebenenfalls Elektrohybridisierung, Elektrowaschen und Elektroelution sowie Elektrodetektion ermöglichen elektrischen Feldes konstanter Spannung oder gepulsten elektrischen Feldes. In bevorzugter Weise kann vorgesehen sein, daß das mindestens eine nichtleitende Rahmenteil mindestens eine Öffnung, zum Beispiel Eingabe- und Entnahmeeinheiten aufweist, die dem Einfüllen beziehungsweise der Entnahme von Probeflüssigkeit dient. Zudem kann vorgesehen sein, zwischen Bereichen des Rahmenteiles und/oder zwischen den Elektroden Meßeinheiten, zum Beispiel optische Meßeinheiten und deren gegebenenfalls vorhandene Anschlüsse zu lokalisieren, die den Nachweis gebundener Nucleinsäuren ermöglichen.

In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die Elektroden aus Aluminium, Edelstahl, Silber, Gold, Platin, Graphit oder ähnlichem

auszuführen, während in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die nichtleitenden Rahmenteile aus Kunststoff, Glas, Silicium oder ähnlichem ausgeführt sind.

Die Erfindung sieht also einen Probenträger vor, in dem das gesamte erfindungsgemäße einstufige Verfahren durchgeführt werden kann, das heißt der Probenaufschluß, die Nucleinsäureisolierung, die Nucleinsäurerereinigung und gegebenenfalls der Nucleinsäurenachweis. Als vorteilhaft erweist sich dabei, daß die Probeflüssigkeit nicht zwischen verschiedenen Behältern transferiert werden muß, sondern daß das Verfahren vielmehr in einem einzigen Behälter durchgeführt werden kann, der in der Lage ist, in seinem Innenvolumen ein elektrisches Feld zu erzeugen, welches dem Probenaufschluß und der Unterstützung der Nucleinsäurebindung an das nucleinsäureaffine Material dient. In besonders bevorzugter Weise ist der Probenträger im Mikrosystemtechnik in der Größe eines Chips ausgeführt, weist also Abmessungen von 1 bis 2 cm² auf. Das Rahmenteil kann demgemäß in solcher Ausführungsform auch flächig, das heißt eben ausgeführt sein, wobei keine Probenkammer vorgesehen ist und die Elektroden in das Rahmenteil integriert vorliegen. Auf diese Weise wird die Menge an Verbrauchsmaterial minimiert und der Probendurchsatz maximiert. Des weiteren bieten sich beispielsweise bei Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Chipgröße Vorteile bezüglich der anzulegenden Spannung, da hohe Feldstärken durch den geringen Elektrodenabstand bereits bei geringen Spannungen erreicht werden können. In vorteilhafter Weise ist die Geometrie des Probenträgers so zu

wählen, daß gegebenenfalls sowohl homogene als auch inhomogene elektrische Felder erzeugt werden können. In bevorzugter Ausführungsform ist ein solcher Chip nach den Prinzipien der Mikrofluidik aufgebaut.

In bevorzugter Weise ist die genannte erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, daß zumindest Teile des dem Innenvolumen zugewandten Bereichs der Elektroden und/oder des Rahmenteils immobilisiertes nucleinsäureaffines Material aufweisen. Demgemäß kann in erfindungsgemäß bevorzugter Weise ein Bereich der Elektroden beispielsweise mit spezifischen oder unspezifischen Oligonucleotiden gekoppelt sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, umfassend ein nucleinsäureaffines Material, zum Beispiel eine nur aus Zufallssequenzen bestehende, vorstehend beschriebene, DNA-Mischung, die an einer Matrix zum Beispiel einer Elektrode immobilisiert ist. Die Erfindung sieht also eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, vor, mit Hilfe derer das vorgenannte Verfahren durchgeführt werden kann, insbesondere mit Hilfe derer Nucleinsäuren aus einer beliebigen Probe in einfacher und kostengünstiger Weise isoliert werden können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfaßt eine Matrix, die beispielsweise als Membran, als Kugelchen

(beads) oder Säulengel ausgeführt sein kann und als Träger oder Grundgerüst für die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung fungiert. Es kann auch vorgesehen sein, magnetische Partikel, zum Beispiel Kugelchen, oder Elektroden, zum Beispiel aus Aluminium, Silber, Edelstahl, Gold, Platin und/oder Graphit als Matrix einzusetzen.

Die Erfindung sieht in vorteilhafter Weise vor, als Material für die Matrix ein chemisch und physikalisch weitgehend inertes Material einzusetzen, wie Glas oder Kunststoff, zum Beispiel Polystyrol oder Polypropylen oder ein entsprechend inertes Elektrodenmaterial.

Insbesondere ist das Material in bevorzugter Ausführungsform der Erfindung geeignet sein, Temperaturunterschiede in einem Intervall zwischen 10°C und 95°C, pH-Unterschiede in einem Intervall zwischen 0 bis 14 und Natrium- beziehungsweise Calciumchloridionenkonzentrationen in einem Intervall von 10 mM bis 2 M ohne signifikante Veränderung der Materialeigenschaften zu tolerieren. Darüber hinaus ist es bevorzugt, daß das eingesetzte Material unlöslich in Wasser Detergentien und Tensidmischungen ist sowie sich chemisch inert gegenüber chaotropen Reagenzien, wie zum Beispiel Isoguanidinthiocyanat, verhält.

Die Matrix ist in vorteilhafter Weise auf ihrer Oberfläche modifiziert, beispielsweise durch das Aufbringen von Biomolekülen, die hochaffin an der Oberfläche des Matrixmaterials binden. Ein derartiges auf der Matrix immobilisiertes Biomolekül kann

zum Beispiel Streptavidin sein. Die Matrixoberfläche kann jedoch auch derart modifiziert sein, daß eine kovalente Bindung zwischen dem nucleinsäureaffinen Material, zum Beispiel den Zufallssequenzen der DNA-Mischung, und der Matrix ermöglicht wird. Demgemäß kann die Matrix Aminogruppen aufweisen, die über einen Dialdehydspace beziehungsweise ein Dialdehydverbindungs molekül, zum Beispiel Glutardialdehyd, unter Bildung einer Schiff'schen Base mit einer zum Beispiel am 5'- oder 3'-Ende der DNA-Zufallssequenzen eingeführten Aminofunktion eine Bindung eingehen kann. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die Matrix vor Modifizierung ihrer Oberfläche zu reinigen, zum Beispiel mit Salpetersäure. Zudem sieht die Erfindung in vorteilhafter Ausführungsform vor, die Oberfläche der Matrix vor der Modifizierung zu silanisieren.

Die als nucleinsäureaffines Material eingesetzten Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung, zum Beispiel die Zufallssequenzen der DNA-Mischung, weisen demgemäß zum Zweck der Immobilisierung an der Matrix ebenfalls Modifikationen, am 3'- oder 5'-Ende, auf. Derartige Modifikationen können beispielsweise mit dem 5'-Ende der DNA-Zufallssequenz verbundene Biomoleküle wie Biotin sein, die hochaffin an auf der Matrix immobilisierte andere Biomoleküle binden, wie beispielsweise Streptavidin. Es kann auch vorgesehen sein, Aminofunktionen, Epoxidgruppen oder Succinimidester oder andere gängige funktionelle Gruppen in die als nucleinsäureaffines Material verwendeten Nucleinsäuren einzuführen vorzugsweise am 5'- oder 3'-Ende, so daß diese unter Bildung einer Schiff'schen Base mit an der Matrix im-

mobilisierten Aldehydgruppen kovalent binden können.

In jedem Fall werden die modifizierten Nucleinsäuren, zum Beispiel die DNA-Zufallssequenzen in Einzelstrangform und die modifizierten Matrix miteinander in Kontakt gebracht, so daß die Nucleinsäuren an der Matrix immobilisiert werden. Die mit dem erfindungsgemäß einzusetzenden nucleinsäureaffinen Material in Form von Nucleinsäuren beladene Matrix wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch als Affinitätsmatrix bezeichnet.

Die erfindungsgemäße Affinitätsmatrix kann in vorteilhafter Weise auch auf der Oberfläche von Partikeln aufgebracht werden, die im Rahmen eines Aufschlusses dem Aufschluß zu- beziehungsweise ausgesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung, insbesondere einer gleichteiligen Mischung, aus 4^x verschiedenen DNA-Zufallssequenzen, wobei x gleich der Kettenlänge der DNA-Zufallssequenz ist, vorzugsweise 5 bis 50, insbesondere 15 bis 30, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehöriger Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 eine Matrix einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Figur 2 eine erfindungsgemäße Vorrichtung beziehungsweise DNA-Affinitätsmatrix,

Figur 3 ein Elektropherogramm,

Figur 4 zwei Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA an unbehandelte und behandelte Glasperlen,

Figur 5 eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in Form eines Probenträgers und

Figur 6 eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung ausgeführt als Chip.

Beispiel 1: Vorrichtung zur DNA-Isolierung

Die Figur 1 zeigt eine Matrix 10, die in Form einer Membran 1 ausgeführt ist. Die Membran 1 ist auf ihrer Oberfläche mit Streptavidinmolekülen 3 beschichtet.

Die Figur 2 stellt eine Affinitätsmatrix 100 dar, die hergestellt wurde, indem die Matrix 10 mit 5' modifizierten chemisch oder synthetisch hergestellten DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' einer DNA-Mischung in Einzelstrangform in Kontakt gebracht wurde, wobei die 5'-Modifikation der DNA-Zufallsse-

quenz diese in die Lage versetzt, hochaffin an die Streptavidinmoleküle 3 zu binden. Die Figur 2 stellt dar, daß die 5'-Enden der DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' jeweils an Biotin 5 gebunden sind. Die Biotinmodifikation am 5'-Ende der DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' bindet hochaffin an die immobilisierten Streptavidinmoleküle 3, so daß eine auf einer Matrix 10 immobilisierte DNA-Mischung mit den einzelnen DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' gebildet wird.

Beispiel 2: Isolierung von DNA aus einem Zellaufschluß

A) Herstellung der Affinitätsmatrix

Für die Versuche wurden Ballotini Micro-Glaskugeln Typ 3000 der Firma Potters-Ballotini GmbH, Kirchheimbolanden verwendet. Ihre Größe war mit bis zu 50 µm angegeben. Um das Ausgangsmaterial zu reinigen und die Oberfläche für die Silanisierung vorzubereiten, wurden die Glaskügelchen in Salpetersäure gekocht. 50 g der Glaskügelchen wurden in einen 1 l-Dreihalskolben mit Rücklaufkühler zu 500 ml circa 7%iger Salpetersäure gegeben. Über einen Heizpilz wurde bis zum Sieden erhitzt und 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Währenddessen wurde über einen Magnetrührer mit Rührfisch gerührt. Nach dem Erkalten wurde die überstehende Flüssigkeit abdekantiert. Die Glaskügelchen wurden dreimal mit Wasser in MilliQ-Qualität gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert. Bei 95°C wurden sie über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Da nach dem Trocknen mit

- 30 -

bloßem Auge noch Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde der gesamte Reinigungsvorgang nochmals wiederholt.

10 g der trockenen und gereinigten Glaskügelchen wurden zu 200 ml trockenem Methanol in einen 250 ml Einhals-Rundkolben gegeben. Der Kolben wurde mit Argon gespült. Es wurden 20 ml 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Fluka) zugegeben. Als Katalysator wurden 0,5 ml Triethylamin zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde abdekantiert und die Glaskügelchen mit Wasser (MilliQ) gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert.

Zunächst wurde aus 160 ml 0,1 M K_2HPO_4 und 40 ml 0,1 M KH_2PO_4 ein Kaliumphosphatpuffer hergestellt und auf pH 7,5 eingestellt. Aus 10 ml 25%iger Glutardialdehyd-Lösung und 90 ml des Kaliumphosphatpuffers wurde eine 2,5%ige Glutardialdehyd-Lösung hergestellt. Zu 40 ml der 2,5%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden 4 g der silanisierten Glaskügelchen zugegeben und circa 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Glaskügelchen wurden anschließend mit Wasser, Kaliumphosphatpuffer und wieder gut mit Wasser gewaschen.

Oligonucleotide (1 μ mol pro Ansatz) (15-mere, jedes 15-mer in gleicher Konzentration, das heißt, es liegt eine Verteilung sämtlicher theoretisch möglicher Oligomere mit den Nucleotiden A,T,G und C in jeweils gleichen Anteilen vor, Firma Interactiva, Ulm, Deutschland) wurden in 1 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. In einem 15 ml Röhrchen (Greiner

GmbH) wurde zu 4 ml Kaliumphosphatpuffer 1 g der silanisierten und mit Glutardialdehyd aktivierten Glaskügelchen sowie 1 ml der Primer-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde kurz in Eis gekühlt. Über Nacht wurde das Röhrchen im Kühlraum auf einen Roller gelegt und dort 17 Stunden gerollt. Die Glaskügelchen wurden in einer Minifuge (Heraeus) 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und zunächst im Kühlschrank aufbewahrt. Das Pellet wurde dreimal in circa 6 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und abzentrifugiert, um ungebundene Primer auszuwaschen. Die Kügelchen wurden mit Wasser (MilliQ) aufgeschlemmt und je zur Hälfte in zwei Eppendorfhüttchen gegeben. Die eine Hälfte wurde so eingefroren, die andere Hälfte wurde in 3 Durchgängen zu je 10 Minuten in der Speedvac getrocknet und ebenfalls im Gefrierschrank gelagert. Um abschätzen zu können, ob tatsächlich Primer gebunden wurden, wurden von der Primer-Stammlösung und vom Überstand nach dem Anfügen UV-Spektren bei 260 nm aufgenommen. Aus den Spektren wurde die jeweilige Primer-Konzentration ermittelt.

B) Zellaufschluß und DNA-Isolierung

In einem Reaktionsgefäß wurden 300 µl einer physiologisch gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,4; 3 mM EDTA) mit 10⁹ KBE/ml an Escherichia coli mit 100000 elektrischen Impulsen einer Feldstärke von 1,5 kV/cm behandelt. Die Zeitkonstante betrug 2 µs (exponentiell abfallende Impulsform). Die Impulsfrequenz betrug 5 Hz. Anschließend wurden 50 bis 500 mg der Oligonucleotid-beschichteten Affinitätsperlen zugegeben. Das Reaktionsgemisch erwärmte

sich dabei, was ausreichte, die freigesetzte doppelsträngige DNA zu denaturieren, so daß sie beim Abkühlen der Reaktionsmischung durch Hybridisierung an die Affinitätsmatrix zu binden vermochte. Durch Unterschichten des Reaktionsgemisches mit Chloroform wurde eine Phasentrennung herbeigeführt, wobei sich die Glasperlen, aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes in der Chloroformphase anreicher-ten. Der wäßrige Überstand, der neben Zelltrümmern alle wasserlöslichen Bestandteile des Zellauf-schlusses enthält, wurde abgenommen und die Glas-perlen, denen die zu isolierende DNA anhaftete, im Vakuum getrocknet.

Wurde die Isolierung der DNA an Dynabeads durchge-führt, wurden 50 µl Zellysat mit 50 µl konjugierten Dynabeads der Konzentration 5 mg/ml in einem Puffer der Zusammensetzung 20 mM Tris/HCl pH = 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA, versetzt. Das resultierende Ge-misch inkubierte hier für 10 Minuten auf einem Rol-ler und für weitere 10 Minuten im Stehen. Die mit DNA beladenen Partikel wurden magnetisch separiert und zweimal mit je 100 µl Waschpuffer nach Herstel-lerangaben gewaschen.

C) Elution von DNA von der Affinitätsmatrix

Die DNA enthaltenden Affinitätsmatrices wurden wahlweise in Wasser oder einem Puffer der Zusam-mensetzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, ph = 8,0 aufgewärmt. Die resultierende Suspension wurde 10 Minuten zum Sieden erhitzt, wobei sich die an die Affinitätsma-trix gebundene DNA löste und mit dem Überstand, in der Hitze, abgenommen werden konnte.

Beispiel 3: DNA-Isolierung und PCR

In einem ersten Experiment wurde die prinzipielle Durchführbarkeit der Isolierung von DNA an immobilisierten DNA-Zufallssequenzen (15-mere, wie in Beispiel 2) gezeigt. Dazu wurden am 5'-Ende biotinylierte DNA-Zufallssequenzen an kommerziell erhältliche Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel immobilisiert und ihre DNA-Bindungseigenschaften mit den Bindungseigenschaften eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungssystems (DYNAL Direct) verglichen. Als Referenz-DNA diente ein das MIF-Gen enthaltendes Plasmid, das aus intakten Escherichia coli Zellen durch chemischen Zellaufschluß freigesetzt wird. Nach der Plasmid-Isolierung wurde das MIF-Gen mit einem geeigneten Sondenpaar amplifiziert und die PCR-Produkte elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchungen sind in Figur 3 dargestellt. Die Bahnen 3 und 4 des Elektropherogramms repräsentieren das MIF-PCR-Produkt von Plasmid-DNA, die an DNA-Zufallssequenzen isoliert werden konnte. Dem sind in den Bahnen 5 und 6 die MIF-PCR-Produkte der mit Hilfe des kommerziellen Systems isolierten Plasmid-DNA gegenübergestellt. Es zeigt sich weder ein qualitativer, noch ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Isolierungsstrategien.

Beispiel 4: Affinitätschromatographie

Die als Affinitätsmatrix zur DNA-Isolierung hergestellten Glasperlen nach Beispiel 2 wurden in eine HPLC-Leersäule übergeführt und dort auf ihre DNA-Bindungskapazität untersucht. Ein wesentlicher Vorteil säulenchromatographischer Verfahren gegenüber sogenannten Batch-Verfahren ist ihre hohe Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, die Versuchsbedingungen (Flußrate, Laufmittel, Temperatur) auf einfache Weise variieren zu können. Die Figur 4 stellt Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA (jeweils 25 µg) bei 50°C und einem Puffer der Zusammensetzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 8,0 an unbehandelte Glasperlen und an Glasperlen mit immobilisierten DNA-Zufallssequenzen dar. Die Differenz der Flächen unter den Kurven (Kurve 1: Glasperlen ohne DNA-Zufallssequenz; Kurve 2: Glasperlen mit DNA-Zufallssequenz) entspricht der DNA-Bindungskapazität der Affinitätsmatrix. Die Flußrate betrug jeweils 0,1 ml/min. Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich (vgl. Figur 4), daß die DNA-Bindungskapazität der mit Zufallssequenzen beschichteten Glasperlen die Bindungskapazität unbeschichteter Glasperlen um das 7,16 fache übertraf.

Beispiel 5: Nucleinsäureisolierung unter Einsatz elektrischer Felder mittels eines Probenträgers in Chipformat

Die Figur 5 zeigt eine Vorrichtung 200, umfassend eine Probenkammer 210 aus vier zu zwei gegenüber-

liegenden Elektrodenpaaren zusammengefaßte Elektroden 220, 220' und einem Rahmenteil 230 aus nicht leitenden Materialien. Der Probenträger ist im Querschnitt rechteckig und im Chipformat aufgebaut, das heißt weist eine Größe von 1 bis 2 cm² auf. Nicht dargestellt ist der Deckel- und Bodenteil der Probenkammer 210. Rahmenteil 230 und die vier flächig ausgebildeten Elektroden 220, 220' bilden die Wände und umschließen ein Innenvolumen das der Aufnahme der Probe dient. Es kann vorgesehen sein, einen Abstand der beiden gegenüberliegend angeordneten und jeweils eine Wand bildenden Elektrodenpaare 220, 220' von 100 nm bis 5 mm und einen Elektroden-durchmesser bis 1 cm auszuführen. Dargestellt ist, daß nicht leitende Bereiche 240 die einzelnen Elektroden 220, 220' der jeweiligen Elektrodenpaare mit ihren Anschlüssen 225 voneinander trennen, so daß inhomogene und annähernd homogene elektrische Felder erzeugt werden können. So kann die Bildung von inhomogenen Feldern durch Anlegen einer Spannung an nur zwei oder drei von vier leitenden Elementen 220, 220' erreicht werden. Vorzugsweise werden die nicht leitenden Bereiche 240 zwischen den leitenden Elementen 220, 220' eines Elektrodenpaars möglichst klein gewählt, so daß annähernd homogene elektrische Felder entstehen können, wenn zum Beispiel die leitenden Elemente, also Elektroden, 220' als Kathode und die leitenden Elemente, also Elektroden, 220 als Anode fungieren. Die Probenkammer 210 weist ein Rahmenteil 230 auf, welches mit Filtern versehene Eingabe- 260 und Entnahmeeinheiten 270 aufweist. Die Eingabe- und Entnahmeeinheiten 260, 270 sind in anschlußartige nicht leitende Elemente 280 des Rahmenteils 230 so eingepaßt, daß der

Probenträger 200 gefüllt und entleert werden kann. Um gegebenenfalls spektrophotometrische oder luminometrische Messungen durchführen zu können, weist die Vorrichtung 200 optische Einheiten 290 zwischen nicht leitenden Bereichen 295 und 280 des Rahmen-teils 230 auf, so daß die optischen Einheiten so angepaßt werden können, daß Anschlüsse entstehen. Zur elektrischen Detektion können die Anschlüsse 225 der Elektroden 220, 220' verwendet werden. Dargestellt ist auch, daß an den Elektroden 220 Zufallssequenzen 300 der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung immobilisiert sind. Es kann auch vorgesehen sein, die Zufallssequenzen 300 zusätzlich oder ausschließlich am nicht leitenden Element 240 im Bereich der Elektroden 220, 220' anzubringen. Um sämtliche Verfahrensschritte unter Einsatz elektrischer Felder, das heißt Probenaufschluß, Nucleinsäureaufreinigung und gegebenenfalls Nucleinsäure-Waschen sowie -detektion mit dem Probenträger 200 durchführen zu können, müssen ein oder mehrere entsprechende spannungsgebende Apparaturen an den Probenträger 200 angeschlossen werden, um so die verschiedenen notwendigen Felder erzeugen zu können. Die erfindungsgemäße Vorrichtung zeichnet sich also insbesondere dadurch aus, daß Teile oder Bereiche der Probenkammer 210, also der Wand, des Boden- und/oder Deckelteils aus Elektroden aufgebaut sind, die mindestens ein elektrisches Feld in der Kammer erzeugen können, wobei in Wänden, Boden oder Deckel Öffnungen zur Probeentnahme, -eingabe und/oder Detektion vorhanden sein können.

Die erfindungsgemäße Verfahrensweise sieht unter Einsatz der vorgenannten Vorrichtung zunächst vor,

daß eine Probe, wie in Wasser befindliche E. coli-Zellen, in den Probenträger 200 eingebracht wird. Anschließend kann gegebenenfalls eine Dielektrophorese unter Einsatz eines elektrischen Feldes zur Konzentrierung beziehungsweise Abtrennung bestimmter biologischer Zellen oder als Voraussetzung für eine Elektrofusion vorgesehen sein, wobei an die Anschlüsse 225 der Elektroden 220, 220' eine entsprechende Spannung angelegt wird. Dabei kann eine Elektrofusion vorgesehen sein, um die Elektrolyse zu unterstützen oder eine Markierung durchzuführen. Anschließend wird eine elektrische Spannung beispielsweise zur Erzeugung gepulster elektrischer Felder oder eines elektrischen Feldes konstanter Spannung so angelegt, daß eine Elektrolyse der biologischen Zellen oder der Viren erfolgt, wobei gegebenenfalls die Bedingungen so eingestellt werden können, daß nur bestimmte biologische Zellen elektrolysiert werden. Vorliegend wird ein elektrisches Feld mit einer Feldstärke von 0,5 bis 50 kV/cm. Anschließend werden die Bedingungen so gewählt, daß die aus den aufgeschlossenen Zellen freigesetzten Nucleinsäuren unter Einsatz eines elektrischen Feldes mit entweder frei in der Probenkammer vorliegenden Zufallssequenzen der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung oder mit den im Anodenbereich an leitenden und/oder nicht leitenden Bereichen der Probenkammer 210 immobilisierten Zufallssequenzen 300 der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung elektrohybridisieren können. Für den Zellaufschluß und die Elektrohybridisierung wurden Impulszahlen von 1000 bis 10000, Impulsdauer beziehungsweise Zeitkonstanten von 2 µs bis 50 ms und Feldstärken von 0,5 bis 20 kV/cm eingesetzt.

Anschließend kann gegebenenfalls elektrostringentes Waschen unter Umpolung und An- beziehungsweise Entreicherung bestimmter Nucleinsäuren und Abtrennung unerwünschter Stoffe, zum Beispiel von Amplifikationsinhibitoren, durchgeführt werden. In der Probenkammer 210 schließt sich anschließend gegebenenfalls eine Elektroelution und gegebenenfalls eine Amplifikation der noch vorhandenen Nucleinsäuren an, vorzugsweise über eine elektrische, isotherme PCR, wie beschrieben in WO 97/47767. Schließlich kann, vorzugsweise elektrisch, eine Detektion der gebundenen oder frei vorliegenden aufgereinigten Nucleinsäuren erfolgen (beschrieben zum Beispiel in Hintsche, 1999, a.a.O.)

Dem Fachmann ist klar, daß zwischen oder nach einzelnen beschriebenen Schritten je nach Isolierstrategie ein Waschen oder Eluieren erwünschter oder gegebenenfalls nicht erwünschter Substanzen oder Nucleinsäuren ebenso wie eine Änderung des elektrischen Feldes hinsichtlich Polung, Feldstärke, Impulszahl, Impulsdauer oder Impulsfrequenz erfolgen kann.

Beispiel 6:

Die Figur 6 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung 400 zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die Vorrichtung 400 aus einem flächig ausgebildeten nichtleitenden Rahmenteil 560 und mindestens zwei in dieses flächig ausgebildete Rahmenteil integrierten Elektroden 500 aufgebaut

ist. Die erfindungsgemäße Vorrichtung 400 ist als Chip ausgeführt, das heißt weist keine aus Wand- oder Deckelteil gebildete Probenkammer auf. Die Erfindung betrifft also auch einen flächig ausgebildeten Probenträger, das heißt einen Chip, aus einer nichtleitenden Chipbasis 560, auch als Rahmenteil bezeichnet, und zwei in diese Chipbasis 560 integrierten flächigen Elektroden 500. In bevorzugter Weise können an den Elektroden 500 nucleinsäureaffine Materialien 550, wie beispielsweise eine DNAMischung aus Zufallssequenzen, immobilisiert sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich durch eine gezielte Ansteuerung der Elektroden in chronologischer Abfolge durchführen, beispielsweise eine Elektrodenansteuerung 1 zum elektrischen Aufschluß des biotischen beziehungsweise abiotischen Materials (Nucleinsäureisolierung), eine Elektrodenansteuerung 2 zur elektrischen Nucleinsäurereinigung, eine Elektrodenansteuerung 3 zur elektrischen isothermen Nucleinsäureamplifikation und eine Elektrodenansteuerung 4 zur elektrischen Detektion.

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei die Probe unter dem Einfluß wenigstens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen wird und die freigesetzten Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß eine Bindung zwischen den freigesetzten Nucleinsäuren und dem nucleinsäureaffinen Material stattfinden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei im Anschluß an das Inkontaktbringen der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material die restliche Probe von den an dem nucleinsäureaffinen Material gebundenen Nucleinsäuren abgetrennt wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld ein gepulstes elektrisches Feld ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das elektrische Feld ein Feld einer konstanten Spannung ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei elektrische Felder eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während des Inkontaktbringens der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material wenigstens ein elektrisches Feld eingesetzt wird, vorzugsweise ein gepulstes elektrisches Feld oder ein elektrisches Feld konstanter Spannung.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld während des Inkontaktbringens der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material umgepolt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die gebundenen Nucleinsäuren gewaschen werden, vorzugsweise unter Einsatz eines elektrischen Feldes.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Anschluß an die Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material oder ein gegebenenfalls erfolgtes Ablösen der gebundenen Nucleinsäure von dem nucleinsäureaffinen Material die Nucleinsäuren optisch, luminometrisch, spektrophotometrisch, radioaktiv oder elektrisch unter Einsatz eines elektrischen Feldes nachgewiesen werden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nucleinsäuren vor dem Nachweis amplifiziert werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material frei in Lösung vorliegt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das nucleinsäureaffine Material an einem Probenträger immobilisiert vorliegt.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material ein Anionentauscher, Silica, Diatomeen, ein nucleinsäurebindendes Protein oder eine Nucleinsäure ist.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material ein fragmentiertes Zielgenom, ein Gemisch von Zufalls-nucleinsäuresequenzen oder eine sequenzspezifische Nucleinsäuresequenz ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Nucleinsäuresequenz ein Oligonucleotid ist.

16. Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines der vorgenannten Verfahren, umfassend mindestens eine Probenkammer (210) mit mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden (220,220') und mindestens einem nicht-leitenden Rahmenteil (230), wobei die mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden (220,220') und das Rahmenteil (230) als Wand-, Deckel- oder Bodenteil der Probenkammer (210) ausgeführt sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei die Elektroden (220,220') aus Aluminium, Edelstahl, Silber, Gold, Platin oder Graphit bestehen oder dieses einzeln oder in Kombination enthält.

- 43 -

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 oder 17, wobei das nicht-leitende Rahmenteil (230) aus Kunststoff, Glas oder Silicium besteht oder diese einzeln oder in Kombination enthält.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei in das mindestens eine Rahmenteil (230) Eingabe- und Entnahmeeinheiten (260,270) integriert sind.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei in das Rahmenteil (230) optische Einheiten (290) integriert sind.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei das nucleinsäureaffine Material an mindestens einer Elektrode (220,220') und/oder dem mindestens einen Rahmenteil (230) immobilisiert ist.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei das nucleinsäureaffine Material Silica, Anionentauscher oder eine Nucleinsäure (300) ist, insbesondere ein fragmentiertes Zielgenom, Zufallssequenzen oder eine sequenzspezifische Nucleinsäuresequenz.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei die Vorrichtung Chipformat von 1 bis 2 cm² aufweist.

24. Vorrichtung zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, umfassend ein flächig ausgebildetes nichtleitendes Rahmenteil (560), mindestens zwei in

- 44 -

dem Rahmenteil (560) integrierte flächig ausgebildete Elektroden (500) sowie auf dem Rahmenteil (560) und/oder den Elektroden (500) immobilisiertes nucleinsäureaffines Material (550).

1/3

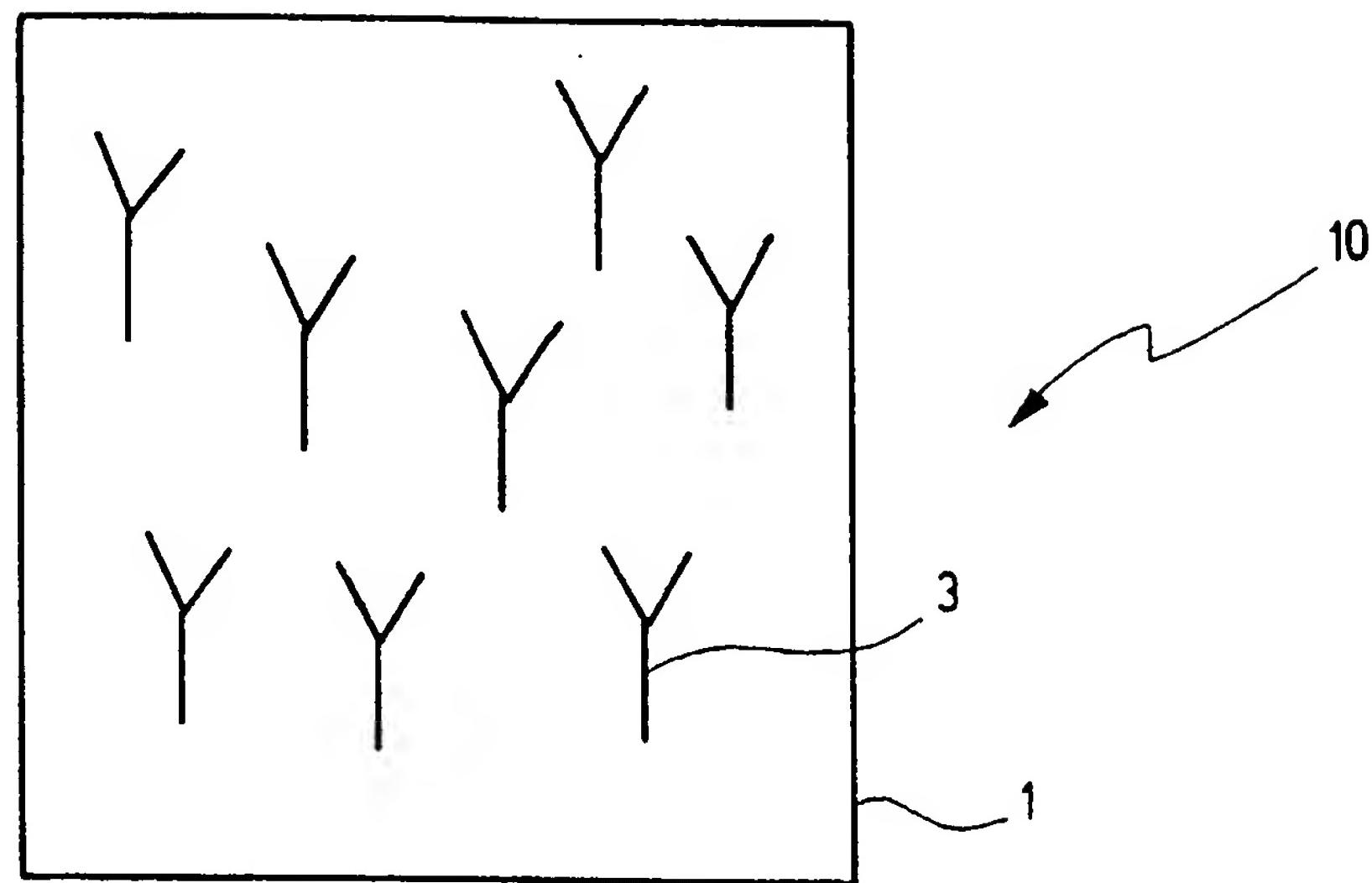


Fig. 1

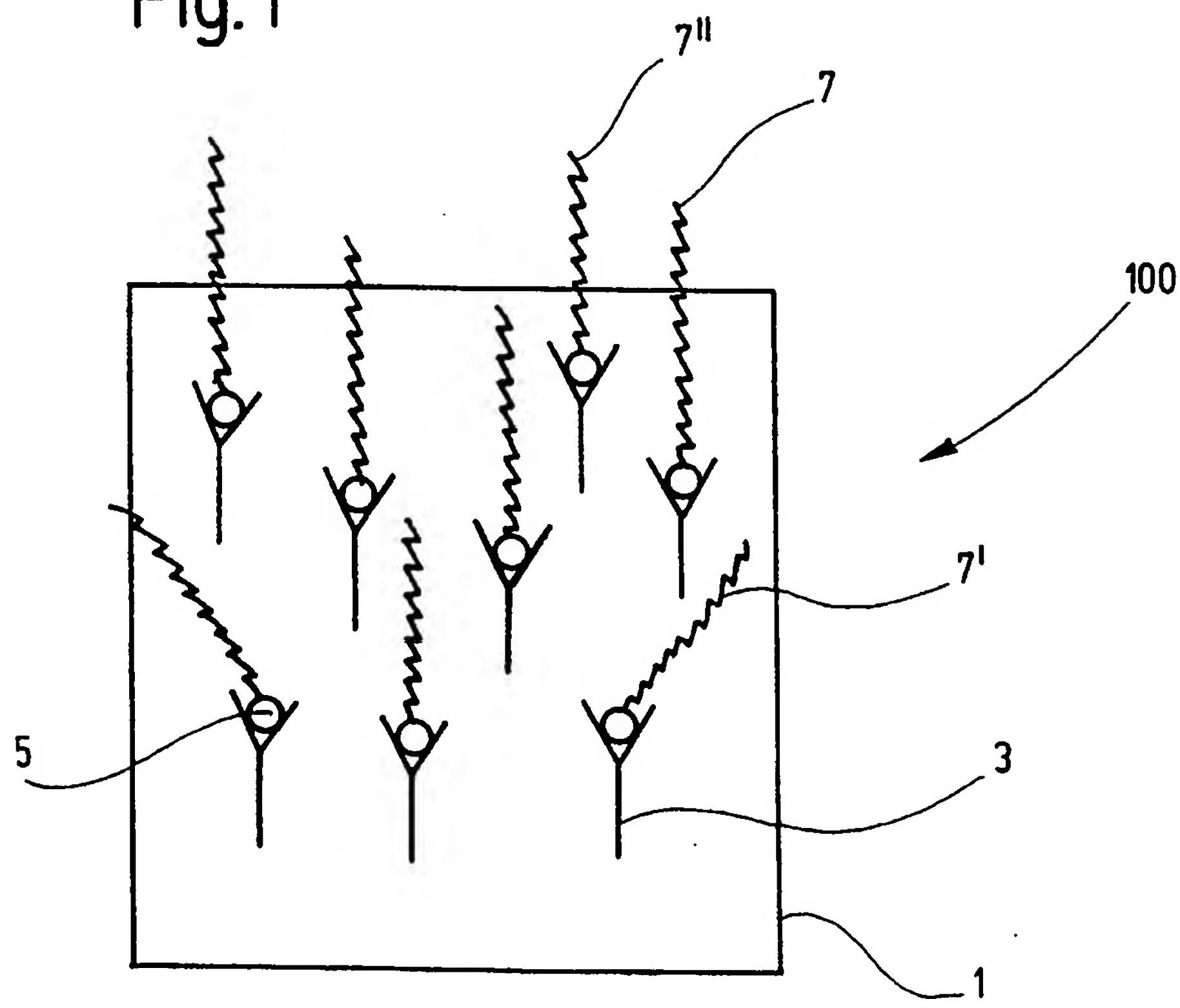


Fig. 2

2/3

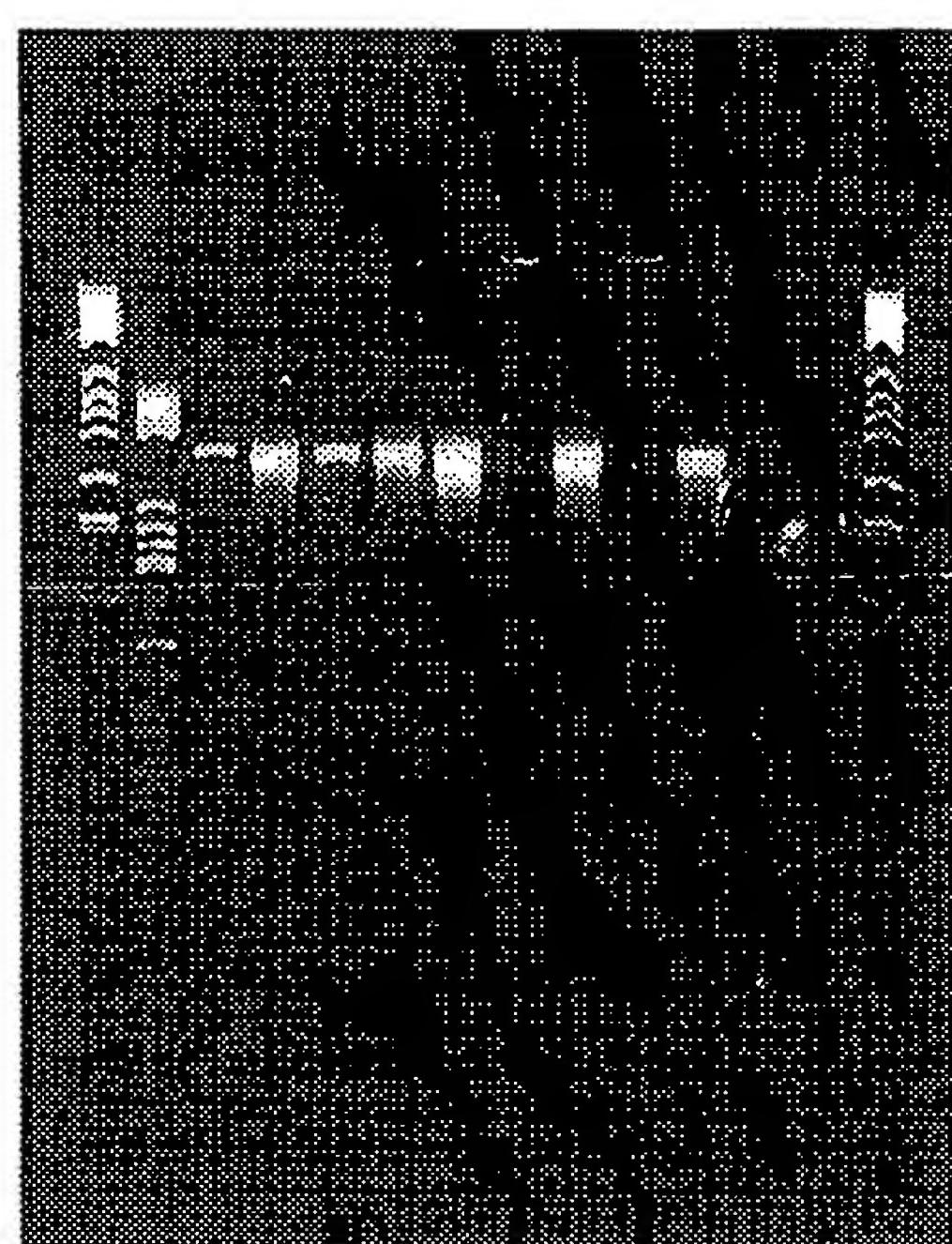


Fig. 3

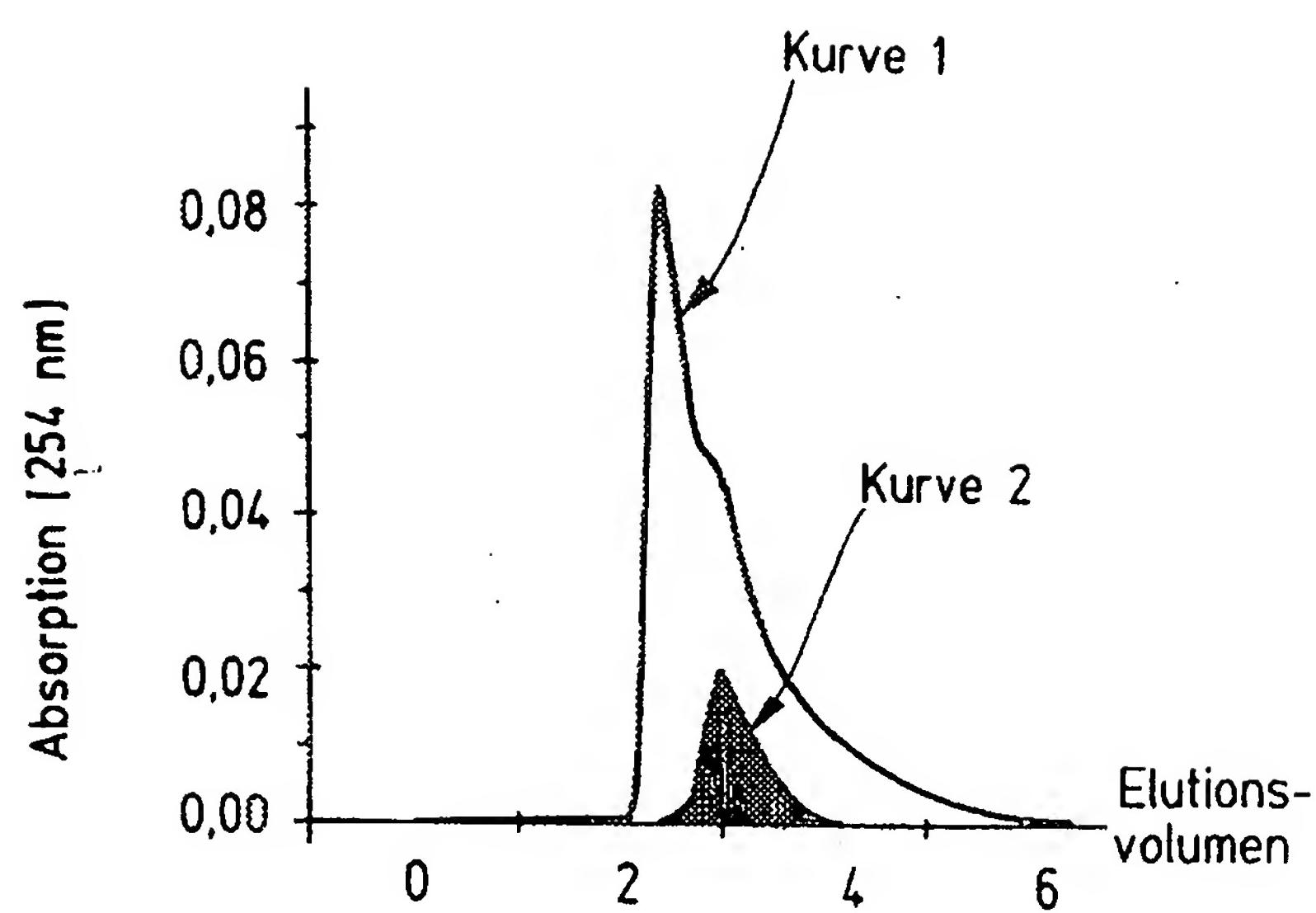


Fig. 4

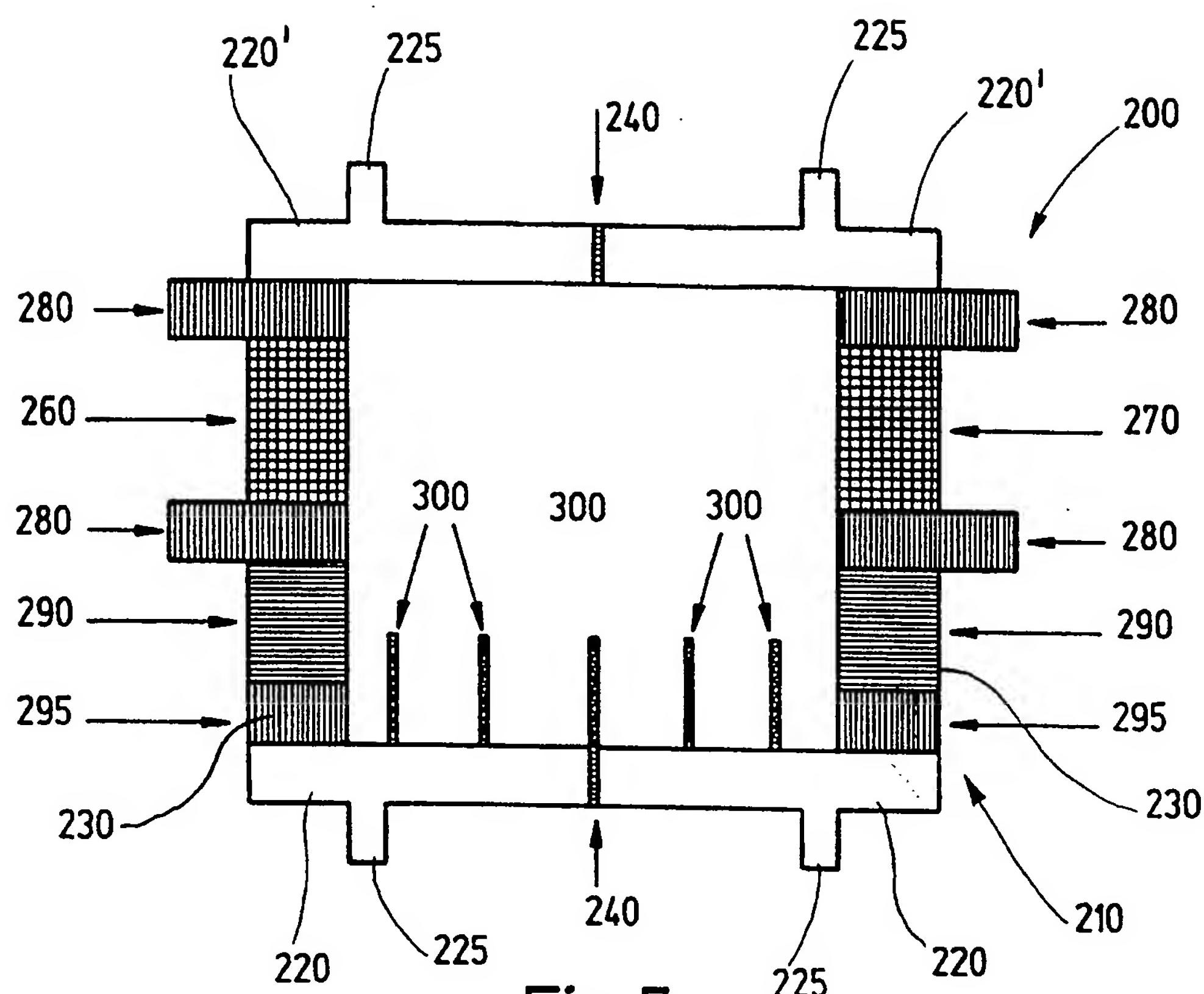


Fig. 5

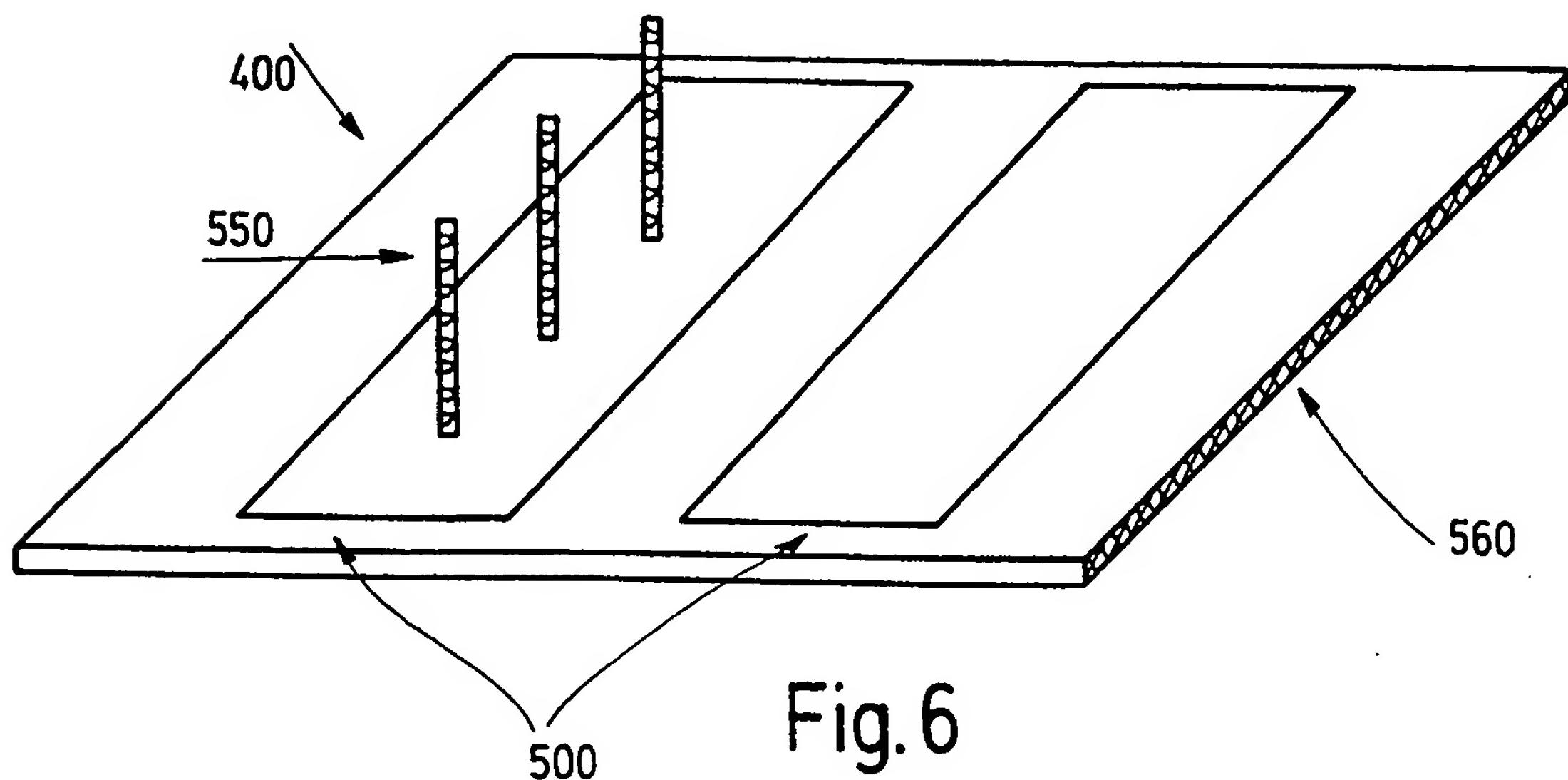


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 99/03047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12Q1/68 C12N15/10 G01N1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12Q C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 297 02 254 U (BERTLING WOLF PROF DR) 3 July 1997 (1997-07-03) see the whole document particularly claims ---	1-24
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 (1997-07-31) see claims ---	1-24
A	EP 0 301 899 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 1 February 1989 (1989-02-01) the whole document ---	
A	WO 93 22678 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ; HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 11 November 1993 (1993-11-11) see claims and figures ---	
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

24 August 1999

30/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03047

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INT INC) 9 October 1986 (1986-10-09) see particularly claims (z.B. 10) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 29702254 U	03-07-1997	DE 19628171 A		15-01-1998
		AU 3537697 A		09-02-1998
		WO 9802399 A		22-01-1998
		EP 0912470 A		06-05-1999

WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A		20-08-1997
		EP 0880598 A		02-12-1998

EP 0301899 A	01-02-1989	CA 1297432 A		17-03-1992
		JP 1125395 A		17-05-1989
		US 4921805 A		01-05-1990

WO 9322678 A	11-11-1993	US 5846708 A		08-12-1998
		EP 0638173 A		15-02-1995
		JP 7508831 T		28-09-1995
		US 5653939 A		05-08-1997

WO 8605815 A	09-10-1986	AU 5667186 A		23-10-1986
		EP 0216844 A		08-04-1987

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68 C12N15/10 G01N1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 297 02 254 U (BERTLING WOLF PROF DR) 3. Juli 1997 (1997-07-03) siehe ganzes Dokument besonders Ansprüche ---	1-24
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31. Juli 1997 (1997-07-31) siehe Ansprüche ---	1-24
A	EP 0 301 899 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 1. Februar 1989 (1989-02-01) das ganze Dokument ---	
A	WO 93 22678 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ; HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 11. November 1993 (1993-11-11) siehe Ansprüche und Abbildungen ---	
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

³ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24. August 1999

30/08/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INT INC) 9. Oktober 1986 (1986-10-09) siehe besonders Ansprüche (z.B. 10) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 29702254	U	03-07-1997	DE	19628171 A	15-01-1998
			AU	3537697 A	09-02-1998
			WO	9802399 A	22-01-1998
			EP	0912470 A	06-05-1999

WO 9727317	A	31-07-1997	AU	2253397 A	20-08-1997
			EP	0880598 A	02-12-1998

EP 0301899	A	01-02-1989	CA	1297432 A	17-03-1992
			JP	1125395 A	17-05-1989
			US	4921805 A	01-05-1990

WO 9322678	A	11-11-1993	US	5846708 A	08-12-1998
			EP	0638173 A	15-02-1995
			JP	7508831 T	28-09-1995
			US	5653939 A	05-08-1997

WO 8605815	A	09-10-1986	AU	5667186 A	23-10-1986
			EP	0216844 A	08-04-1987



PCT

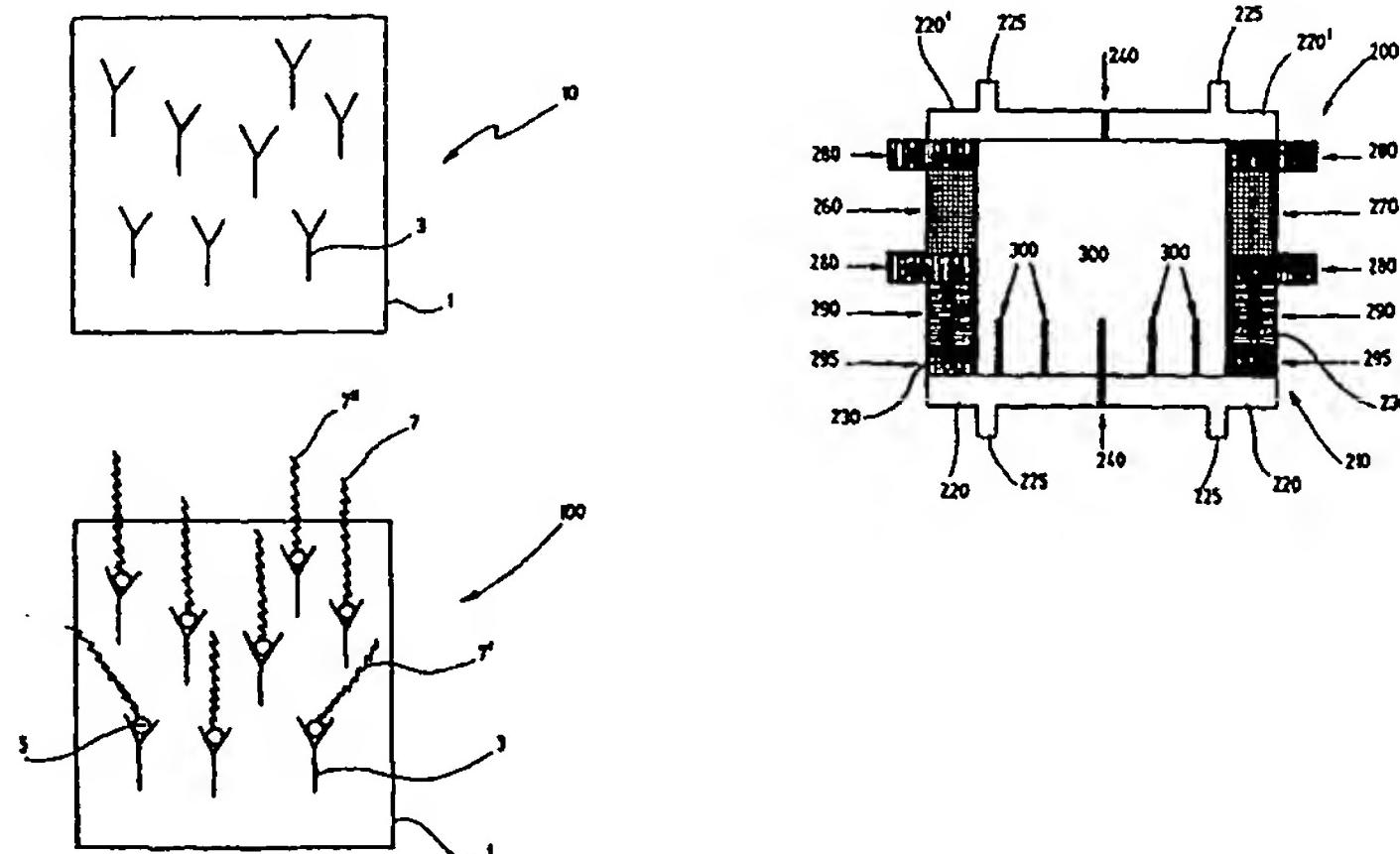
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68, C12N 15/10, G01N 1/34	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57314 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03047		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 1999 (04.05.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 19 889.2 4. Mai 1998 (04.05.98) DE 199 06 277.3 15. Februar 1999 (15.02.99) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 59, D-80636 München (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, D-72074 Tübingen (DE). BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der Betteleiche 6, D-70569 Stuttgart (DE). VITZTHUM, Frank [DE/DE]; Zeppelinstrasse 40, D-71157 Hildrizhausen (DE). ELKINE, Bentsian [-/DE]; Kaiserstrasse 8, D-70599 Stuttgart (DE). GEIGER, Georg [DE/DE]; Gabelsbergerstrasse 39, D-75175 Pforzheim (DE). TOVAR, Günter [DE/DE]; Oberer Grundweg 25, D-70563 Stuttgart (DE).		
(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).		

(54) Title: ELECTRICAL INTEGRATED NUCLEIC ACID ISOLATION, PURIFICATION AND DETECTION

(54) Bezeichnung: ELEKTRISCHE, INTEGRIERTE NUCLEINSÄUREISOLIERUNG, -REINIGUNG UND -DETEKTION



(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for the isolation and purification of nucleic acids. According to the invention, after decomposition of a sample the nucleic acids present in said sample are isolated and purified.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Nucleinsäureisolierung und Reinigung, wobei im Anschluß an einen Probenaufschluß eine Isolierung und Aufreinigung von in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren erfolgt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Elektrische, integrierte Nucleinsäureisolierung,
-reinigung und -detektion

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere einem biotischen oder abiotischen Material.

Die spezifische oder quantitative Isolierung von Nucleinsäuren aus bestimmten Ausgangsmaterialien spielt in einer Vielzahl von wissenschaftlichen, industriellen oder sonstigen Bereichen eine große Rolle. Derartige Bereiche sind zum Beispiel die Umweltanalytik, Kriminaltechnik, Grundlagenforschung, Lebensmitteldiagnostik, Veterinärdiagnostik, Epidemiologie, Tumordiagnostik, Erbgutanalyse, Analyse von Erbkrankheiten und Infektionskrankheiten, Monitoring von Krankheiten, Therapie von Krankheiten, Früherkennung von Multiple-Drug-resistanten Keimen, Bodenuntersuchungen, Suche und Entwicklung von Pharmaka und Impfstoffen, Agrotechnik oder ähnliches. Ebenso vielfältig wie die Anwendungsbereiche können die Ausgangsmaterialien für die Isolierung der Nucleinsäuren sein, beispielsweise eukaryotische oder prokaryotische Zellen oder deren Homogenate, Bodenproben, Blutproben, Körperflüssigkeiten oder Gewebehomogenate. In Abhängigkeit von diesem Ausgangs- oder Probenmaterial müssen unterschiedliche Aufschlußverfahren eingesetzt werden, um die beispielsweise in Zellen und/oder Zellkernen

vorhandenen Nucleinsäuren einer Isolierung zugänglich zu machen. Häufig eingesetzte Aufschlußverfahren sind zum Beispiel die Ultraschall- und/oder Enzymbehandlung. Nach Durchführung der Aufschlußbehandlung werden die Nucleinsäuren beispielsweise mittels Gelelektrophorese, Ultrazentrifugation oder Affinitätschromatographie isoliert.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren wie Enzym-Immuno-Assays (EIA), Zellkulturen und Tierversuchen liefern genetische Untersuchungen über eine entsprechende Nucleinsäurediagnostik recht schnell empfindlichere und spezifischere Aussagen, so daß Kosten reduziert werden können. Die Nucleinsäurediagnostik basiert auf der Nucleinsäureisolierung, das heißt der Probenvorbereitung zur Freisetzung von Nucleinsäuren aus biologischem Material, der Nucleinsäurereinigung, deren Nachweis und der anschließenden Auswertung siehe zum Beispiel Lichtensteiger et al., J. Clin. Microbiol. 34 (1996), 3035 bis 3039.

Die für eine Nucleinsäurediagnostik einsetzbare Affinitätschromatographie beruht im wesentlichen auf der Fähigkeit von Nucleinsäuren, reversibel an positiv geladene und/oder positivpolare Matrizes zu binden. In der Regel wird zunächst eine anionische oder polare Bindung der Nucleinsäuren an die Matrix erwirkt und anschließend die Nucleinsäure durch Einsatz geeigneter Lösemittel von Verunreinigungen befreit. In einem zweiten Schritt wird die an die Matrix gebundene Nucleinsäure unter Einsatz eines weiteren Lösemittels, beispielsweise mit höherer Ionenstärke, von der Matrix gelöst. Anschließend

muß die so isolierte Nucleinsäure im allgemeinen wieder deionisiert werden, um für weitere Untersuchungen verwendet werden zu können.

Als nachteilig erweist sich dabei, daß je nach eingesetztem Probenmaterial und durchgeföhrtem Aufschlußverfahren unterschiedliche Isolierungsstrategien entwickelt und eingesetzt werden müssen. Zudem ist es nicht möglich, Probenaufschluß und Nucleinsäureisolierung beziehungsweise -reinigung in einem Verfahrensgang vorzunehmen.

Sowohl DNA als auch RNA wird herkömmlicherweise auch mittels Ultrazentrifugation isoliert, wobei häufig Protease- und Phenolbehandlungen durchgeführt werden müssen. Diese Verfahrensweise weist den Nachteil auf, daß insbesondere hochmolekulare DNA selbst nach Durchführung der Isolierung häufig noch mit Proteinen verunreinigt sind und die Moleküle aufgrund der einwirkenden Scherkräfte der Gefahr des Zerbrechens ausgesetzt sind. Zudem ist die Phenolbehandlung gesundheits- und umweltschädlich.

Eine weitere Methode basiert auf der Bindung von Nucleinsäuren an Silicamaterialien unter Hochsalzbedingungen, wie 6 M GdnSCN, welches zuvor dann auch als Zellaufschlußagens diente. Der Einsatz von solchen Stoffen ist jetzt wegen deren Giftigkeit, Viskosität und Hemmung nachfolgender Prozesse wie der PCR nachteilig.

Auch die zur Nucleinsäureisolierung oftmals eingesetzte Gelelektrophorese weist unter anderem aufgrund der notwendigen vergleichsweise umständlichen

Vor- und Nachbehandlung der Proben beziehungsweise Nucleinsäuren Nachteile auf.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem liegt also darin, ein kostengünstiges und einfach durchzuführendes Zellaufschluß- und Isolierungsverfahren für Nucleinsäuren bereitzustellen, das aus beliebigem biotischem und/oder abiotischem Probenmaterial bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren in besonders reiner Form bereitstellt. Dieses Verfahren soll grundsätzlich in der Lage sein, sowohl quantitativ Nucleinsäuren als Substanzklasse aus vielen verschiedenen Einzelindividuen als auch spezifisch ganz konkrete Nucleinsäuresequenzen isolieren und reinigen zu können.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei die Probe unter dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen wird und die freigesetzten Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß zumindest ein Teil der Nucleinsäure an das nucleinsäureaffine Material binden kann. Die Erfindung betrifft insbesondere ein vorgenanntes Verfahren, wobei ein frei beziehungsweise ungebunden vorliegendes oder immobilisiertes nucleinsäureaffines Material mit der Probe nach deren elektrisch bewirkten Aufschluß so in Kontakt gebracht wird, daß eine Bindung beziehungsweise Hybridisierung von in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material stattfinden kann und wobei gegebenenfalls die

gebundenen Nucleinsäuren nach einem gegebenenfalls erfolgenden Waschschnitt von dem nucleinsäureaffinen Material abgelöst und zum Beispiel amplifiziert, nachgewiesen oder sonstwie verwendet werden können. Dabei kann „affin“ auch die Bindung von Nucleinsäuren an positive geladene Materialien bedeuten.

Die Erfindung stellt also ein affinitätschromatographisches Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren bereit, bei dem in einer Probe enthaltene Nucleinsäuren nach Aufschluß der Probe mittels mindestens eines elektrischen Feldes mit einem nucleinsäureaffinen Material in Kontakt gebracht werden und dieses nucleinsäureaffine Material spezifisch einzelne, mehrere oder alle beziehungsweise im wesentlichen alle in der Probe enthaltenen Nucleinsäuren, zum Beispiel DNA oder RNA, bindet und damit von den anderen Probenbestandteilen wie Proteinen, Kohlenhydraten, Fetten oder gegebenenfalls nicht interessierenden Nucleinsäuren etc. isoliert. Die dabei einzuhaltenden Hybridisierungsbedingungen wie Temperatur und Pufferzusammensetzung und/oder die elektrischen Parameter des Feldes wie Impulszahl, Impulsfrequenz oder Feldstärke hängen von der jeweiligen konkreten Isolieraufgabe ab.

Die Erfindung stellt in vorteilhafterweise also ein einstufiges Verfahren bereit, wobei im Rahmen eines einzigen Verfahrensschrittes eine Probe unter dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen und gleichzeitig oder anschließend die freigesetzten und ursprünglich in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß je nach

eingesetztem nucleinsäureaffinen Material entweder quantitativ alle oder im wesentlichen alle Nucleinsäuren oder aber nur einzelne Nucleinsäuregruppen beziehungsweise einzelne spezifische Nucleinsäuresequenzen abgetrennt werden können.

Die Erfindung ermöglicht eine universell einsetzbare, standardisierbare und automatisierbare Nucleinsäurediagnostik zur Gen- und Genomanalyse mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise weist eine hohe Schnelligkeit auf, wobei der einzusetzende Materialaufwand gering und der Einsatz kostenintensiver und giftiger Substanzen minimiert ist. Schließlich ist das Risiko von Querkontaminationen vermindert, so daß die Empfindlichkeit des Verfahrens groß ist. Zudem läßt sich das Verfahren kostengünstig realisieren. Das erfindungsgemäße Verfahren weist ferner den Vorteil auf, daß bei der Nucleinsäureisolierung und -reinigung ein derart hoher Reinigungsgrad der Nucleinsäuren erreicht wird, daß anschließend eine Amplifikation von Nucleinsäuren ohne Störung durch Amplifikationsinhibitoren und Querkontaminationen möglich ist, die zur falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnissen führen würde. So kann zum Beispiel der elektrische Zellaufschluß gänzlich ohne Zugabe von chemischen Aufschlußreagenzien, die wiederum stören könnten, erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die Probe dem Einfluß mindestens eines elektrischen Feldes konstanter Spannung oder eines gepulsten elektrischen Feldes zur Freisetzung der Nucleinsäuren und/oder Lyse der biologischen

Probe auszusetzen. Durch die Einwirkung des elektrischen Feldes und den elektrischen Durchbruch entstehen in den Lipidschichten, aus denen die Zellmembran besteht, Poren. Im Rahmen des Einsatzes gepulster elektrischer Felder kann eine Elektroporation und eine osmotische Lyse von Zellen kombiniert werden, so daß die in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren vollständig freigesetzt und auch gereinigt werden können. Geeignete Parameter für gepulste elektrische Felder sind zum Beispiel in Kinosita und Tsong, Nature 268 (1977), 438 bis 441, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 1923 bis 1927 oder Benz und Zimmermann, Bioelektrochem. Bioenerg. 7 (1988), 723 bis 739 beschrieben, die insoweit in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß es sich bei dem hier beschriebenen Verfahren nicht um die Elektroporation handelt, die bekannt ist, sondern um den umgekehrten Vorgang des Nucleinsäureaustritts. Erfindungsgemäß können Feldstärken von 0,5 bis 50, vorzugsweise 5 bis 30 kV/cm, und Pulslängen beziehungsweise Zeitkonstanten von ca. 0,5 μ s bis 50 ms sowie zum Beispiel 1 bis 1000000, vorzugsweise 1000 bis 10000 Impulse, eingesetzt werden. Selbstverständlich können jedoch auch erheblich davon abweichende elektrische Parameter eingesetzt werden. Die Impulsform kann zum Beispiel rechteckig, exponentiell abnehmend oder sinusartig, vorzugsweise im Radiofrequenzbereich, sein. Das elektrische Feld kann dabei sowohl durch Wechsel- als auch Gleichspannung erzeugt werden. Übliche elektrische Parameter sind zum Beispiel auch in den US-PS 5,447,733; US-PS 5,235,905 oder US-PS 5,393,541 beschrieben, die insofern in den vorlie-

genden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Die einzusetzenden Feldstärken liegen bevorzugt über der kritischen Spannung V_c über der Membran des biologischen Materials. Weitere geeignete Bedingungen sind beispielsweise in Vitztum et al., FEBS Abstracts, 155 (1998) beschrieben, das insoweit ebenfalls in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen ist. Bei der Verwendung von gepulsten elektrischen Feldern zur Nucleinsäureisolierung ist es beispielsweise erfindungsgemäß möglich, über die Wahl der Behandlungsparameter nur bestimmte Zelltypen in einer Suspension verschiedener Zelltypen, also der eingesetzten Probe, zu lysieren. Dadurch können bestimmte Nucleinsäuren eines Zelltyps von Nucleinsäuren eines anderen Zelltyps abgetrennt werden. Zudem kann durch den Einsatz gepulster elektrischer Felder eine selektive Freisetzung von Nucleinsäuren aus Zellen eines Zelltyps durch Wahl der geeigneten Bedingungen bewirkt werden, wobei der entstehende chromatographische Effekt zu einer Kombination einer Nucleinsäureisolierung mit einer Nucleinsäurereinigung führt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird für den Zellaufschluß ein elektrisches Feld mit konstanter Spannung eingesetzt, unter Bedingungen wie sie beispielsweise in Pollard-Knight et al. WO 97/41219 (1997) beschrieben sind, das insofern in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen ist.

Während des Probenaufschlusses können mit Hilfe der elektrischen Felder durch Zellfusion auch Substanzen in die Zellen oder Micellen eingebracht werden,

die später die Lyse und/oder Nucleinsäurefreisetzung unterstützen, spezifizieren oder der Markierung für eine spätere Detektion dienen.

Selbstverständlich ist es erfindungsgemäß auch bevorzugt, mehrere gleiche oder verschiedene elektrische Felder gleichzeitig oder nacheinander auf die Probe einwirken zu lassen.

Es ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, den Zellaufschluß durch den Einsatz hoher Temperaturen, zum Beispiel von 30°C bis 95°C, zu unterstützen.

Selbstverständlich ist es auch möglich, den Probenaufschluß mit anderen Parametern des elektrischen Feldes durchzuführen und/oder gegebenenfalls chemische Agenzien, zum Beispiel chaotrope Substanzen oder Detergenzien, zusätzlich vorzusehen, die den Zellaufschluß unterstützen, zum Beispiel SDS, Lipasen, Proteasen wie die Proteinase K oder DMSO (Dimethylsulfoxid), Harnstoff, Guanidiniumthiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorid.

Bevorzugt ist es jedoch, das erfindungsgemäße Verfahren ohne Zusatz chemischer Substanzen, zum Beispiel ausschließlich in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Pufferlösung durchzuführen.

Tatsächlich liegt ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung nämlich darin, für den Zellaufschluß keine chaotropen Reagenzien oder Detergenzien einsetzen zu müssen, sondern den Zellaufschluß in physiologischer Lösung, Pufferlösung oder Wasser durchführen zu können.

In besonders vorteilhafter Weise kann vorgesehen sein, die mit dem immobilisierten oder freien nucleinsäureaffinen Material in Kontakt gebrachte Probe Ultraschalleinfluß in Kombination mit der elektrischen Behandlung, zum Beispiel durch elektrische Funkenentladung wie beschrieben in US 5,368,724, auszusetzen, um einen Probenaufschluß, insbesondere Zellaufschluß, zu unterstützen. Dies führt gleichzeitig zu einer Erwärmung des Reaktionsgemisches aus Probe und nucleinsäureaffinem Material, so daß die in der Probe enthaltende DNA denaturiert wird und beim Abkühlen an die immobilisierte DNA-Mischung binden kann. Zusätzlich findet eine gegebenenfalls vorteilhafte Fragmentierung der Nucleinsäure statt. Die Ultraschallbehandlung unterstützt also den Probenaufschluß und/oder die Bindung der Nucleinsäure an das nucleinsäureaffine Material.

Erfindungsgemäß ist es bevorzugt vorgesehen, nicht nur den Zellaufschluß, sondern auch die Bindung der freigesetzten Nucleinsäuren an das frei oder immobilisiert vorliegende nucleinsäureaffine Material unter Einsatz eines elektrischen Feldes durchzuführen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß während des Inkontaktbringens der freigesetzten Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material mindestens ein elektrisches Feld, zum Beispiel ein oder mehrere gepulste elektrische Felder und/oder eine oder mehrere Felder konstanter Spannung eingesetzt werden,

um so eine Elektrohybridisierung zu bewirken. Die Elektrohybridisierung begünstigt die Hybridisierung beziehungsweise Bindung oder Adsorption der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material und kann die Spezifität der Bindung verbessern. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die freigesetzten elektrisch negativ geladenen Nucleinsäuren unter Anlegen einer elektrischen Spannung zunächst im Bereich der Anode einer für die Durchführung des Verfahrens eingesetzten Probekammer anzureichern, wobei beispielsweise vorteilhafterweise vorgesehen sein kann, im Anodenbereich immobilisiertes nucleinsäureaffines Material vorzusehen, so daß im Bereich dieses nucleinsäureaffinen Materials eine lokal hohe Nucleinsäurekonzentration auftritt, die eine Adsorption beziehungsweise Hybridisierung kinetisch und thermodynamisch begünstigt. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, während des Anliegens des elektrischen Feldes beim Inkontaktbringen der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material ein Umpolen des elektrischen Feldes vorzunehmen, so daß aufgrund der veränderten kinetischen und thermodynamischen Bedingungen im Kathodenbereich elektrostringent gewaschen werden kann.

Sofern freie nucleinsäureaffine Materialien, zum Beispiel ungebundene Zufallssequenzen eingesetzt werden, können bei Anlegen eines elektrischen Feldes konstanter Spannung oder eines gepulsten elektrischen Feldes im Rahmen der erfindungsgemäß vorgesehenen Elektrohybridisierung die elektrophoretischen Effekte, die sich bei der Wanderung der negativ geladenen Nucleinsäuren mit dem vorzugsweise

auch negativ geladenen nucleinsäureaffinen Material einstellen, ausgenutzt werden.

Liegt das nucleinsäureaffine Material erfindungsgemäß also frei während des Probenaufschlusses vor, muß es vorzugsweise eine negative Nettoladung besitzen, um über elektrophoretische Effekte die Nucleinsäurereinigung zu unterstützen. Im elektrischen Feld, vorzugsweise in einem inhomogenen elektrischen Feld, wandert das nucleinsäureaffine Material und die freigesetzten Nucleinsäuren in dieselbe Richtung zur Anode hin, so daß sich deren Konzentration dort lokal erhöht. Neben der Abtrennung von Substanzen anderer elektrischer Eigenschaften hat dies den Vorteil, daß die Assoziation von nucleinsäureaffinen Material und Nucleinsäure kinetisch und thermodynamisch begünstigt wird.

Liegt das nucleinsäureaffine Material immobilisiert, zum Beispiel an den Probenträger gebunden vor, kann erfindungsgemäß eine Elektrohybridisierung durchgeführt werden. Außerdem kann während oder nach der Elektrohybridisierung ein elektrostringentes Waschen und eine Elektroelution durchgeführt werden, wie sie beispielsweise in Hintsche, Medizinische Genetik 11 (1999), 12 bis 13, Cheng et al., Anal. Chem. 70 (1998), 2321 bis 2326, Cheng et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998), 541 bis 546, DE 196 281 71 und US 5,632,957 beschrieben sind, die insofern in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind. Selbstverständlich kann auch im Fall der Verwendung von freiem, nucleinsäureaffinen Material gegebenenfalls ein

elektrostringentes Waschen und eine Elektroelution vorgesehen sein.

Die Erfindung sieht also in bevorzugter Ausführungsform vor, daß sowohl während des Probenaufschlußes als auch während des gleichzeitig oder darauffolgend stattfindenden Inkontaktbringens des nucleinsäureaffinen Materials mit den Nucleinsäuren ein oder mehrere elektrische Felder, die gegebenenfalls umgepolt werden, eingesetzt werden, um so eine Freisetzung der Nucleinsäuren und eine selektive Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material zu ermöglichen. Gegebenenfalls kann durch den Einsatz des elektrischen Feldes auch ein Waschen der gebundenen Nucleinsäuren stattfinden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß auch der nachfolgende Nachweisschritt der aufgereinigten Nucleinsäuren mittels eines elektrischen Feldes durch elektrische Detektion stattfindet. Dabei kann verfahren werden, wie in Hintsche, Medizinische Genetik 11, (1999) 12 bis 13 beschrieben. Der Nachweis kann jedoch auch mittels herkömmlicher optischer, spektrophotometrischer, luminometrischer oder radioaktiver Verfahrensweisen erfolgen.

Die nucleinsäureaffinen Materialien können entweder frei in Lösung oder an eine Matrix, zum Beispiel einen Probenträger oder die Elektroden selbst immobilisiert vorliegen. Als Matrix kann zum Beispiel auch eine Elektrode oder ein Wandbereich aus nicht leitendem Material einer Probenkammer dienen.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, daß nach Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material die restliche Probe von den an das nucleinsäureaffine Material gebundenen Nucleinsäuren abgetrennt und die isolierten Nucleinsäuren in bevorzugter Ausführungsform gewaschen werden, zum Beispiel ebenfalls unter Einsatz eines elektrischen Feldes, das heißt es wird ein elektrostringentes Waschen durchgeführt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, daß nach der Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material entweder vor oder nach der Abtrennung der restlichen Probe ein Nachweis der gebundenen Nucleinsäure, gegebenenfalls nach vorheriger Amplifikation beispielsweise mittels PCR, durchgeführt wird, insbesondere optisch zum Beispiel luminometrisch oder spektrophotometrisch, radioaktiv oder elektrisch.

In besonders bevorzugter Ausführungsform ist es möglich, den Probenaufschluß, die Probenaufreinigung und den Nachweis in einem einstufigen Verfahren in ein und demselben Probenträger durchzuführen, wobei vorzugsweise während des gesamten Prozesses ein elektrisches Feld angelegt beziehungsweise zu bestimmten Zeiten zugeschaltet wird, welches den Probenaufschluß, die Nucleinsäureaufreinigung und die Detektion gewährleistet. Die gegebenenfalls durchgeführte Amplifikation der nachzuweisenden Nucleinsäuren kann erfindungsgemäß eine elektrische isotherme Amplifikation sein, wie sie in WO 98/02573, WO 93/15224 oder WO 95/25177 be-

schrieben ist und die insoweit in den vorliegenden Offenbarungsgehalt mit einbezogen sind.

Die Erfindung stellt also ein Verfahren zur Verfügung, gemäß dem die Nucleinsäureisolierung aus einer Probe, die Nucleinsäurereinigung durch Bindung an nucleinsäureaffines Material, gegebenenfalls das Waschen der isolierten Nucleinsäuren und der Nachweis in einem einstufigen Verfahren unter Einsatz mindestens eines elektrischen Feldes durchgeführt wird. Die dadurch erzielte Integration ermöglicht die Grundlage für ein Produkt, das heißt eine Vorrichtung, mittels derer alle vorgenannten Schritte in einem Arbeitsgang in einer Probenkammer durchgeführt werden können, das heißt, dadurch wird die Nucleinsäurediagnostik erheblich beschleunigt, die Gefahr von Querkontaminationen vermindert, die Empfindlichkeit und Spezifität gesteigert sowie eine Automatisierung auch im Chipmaßstab, also im mm-Bereich ermöglicht.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer Probe jedes beliebige organische, anorganische oder biotisch/abiotische Material verstanden, sofern dieses eine Nucleinsäure, also DNA oder RNA, enthält. Eine Probe kann demgemäß eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle oder ein Zellhomogenat, ein Virus, zum Beispiel enthalten in einer Virussuspension, Blut, Sperma, Lymph- oder sonstige Körperflüssigkeit, Organ- oder Gewebepräparat, Wasser- oder Bodenproben, Liposomen, Zellorganelle, Zellkern, Hefe, Pflanzenhomogenate, Bernstein oder sonstiges sein. Die Probe weist vorzugsweise

- 16 -

Wasser oder eine physiologische Salzlösung oder Pufferlösung als Lösungsmittel auf.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter Probenaufschluß die möglichst vollständige Freisetzung von Nucleinsäuren, gegebenenfalls die Sequenz- und/oder Kompartiment-selektive Freisetzung von Nucleinsäuren aus einem biologischen Material, einer Probe also, verstanden, die mit Zerstörung der Probe, zum Beispiel Lyse, oder reversibler Schädigung der Probe, zum Beispiel Porenbildung einhergehen kann.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem nucleinsäureaffinen Material ein Material verstanden, das in der Lage ist, Nucleinsäuren, vorzugsweise reversibel, zu binden. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist das nucleinsäureaffine Material ein Material, das hinsichtlich der konkreten Nucleinsäuresequenz unspezifisch alle oder im wesentlichen alle Nucleinsäuren einer Probe bindet, zum Beispiel Silica, Diatomeen oder Anionentauscher. Auch nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Gemische, Proteine, Kohlenhydrate, Glycoproteine oder Proteoglycane sind Materialien, die quantitativ Nucleinsäuren binden, also nucleinsäureaffine Materialien im Sinne der Erfindung. Selbstverständlich wird unter einem nucleinsäureaffinen Material auch Material verstanden, das nur bestimmte Nucleinsäuren bindet, das heißt eine Nucleinsäurespezifität aufweist, wie beispielsweise fragmentierte Zielgenom. Unter nucleinsäureaffinen Material wird jedoch auch eine höchst sequenzspezifische Nucleinsäure verstanden,

die ganz spezifisch nur ein konkretes Nucleinsäure-spezies aus einer viele Nucleinsäurespezies enthaltenen Probe isoliert und bindet, zum Beispiel eine bestimmte cDNA oder genomische DNA-Sequenz. In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung sind die nucleinsäureaffinen Materialien zum Beispiel Zufallsoligonucleotide oder sequenzspezifische Oligonucleotiden von zum Beispiel 7 bis 50 Nucleotiden Länge.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung eine Mischung aus DNA-Zufallssequenzen, die auch als random primer bezeichnet werden, verstanden, die nicht spezifisch auf eine konkret zu isolierende Nucleinsäure zusammengestellt ist, sondern jede beliebige Nucleotidpermutation aufweist, so daß unterschiedslos alle in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren mit für eine Hybridisierung ausreichende Kettenlänge gebunden werden. Die DNA-Zufallssequenzen weisen eine im wesentlichen einheitliche, aber beliebige Kettenlänge auf, vorzugsweise eine durchschnittliche Kettenlänge von 15 bis 30. Die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung weist also eine Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Molekülen in Einzelstrangform auf, deren Sequenz jeweils zufallsgemäß zusammengesetzt ist.

Bei der Herstellung dieser DNA-Mischung wird so vorgegangen, daß im Verlauf der DNA-Synthese die vier am DNA-Aufbau beteiligten Nucleoside, das heißt Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin und Desoxythymidin sowie gegebenenfalls deren je-

weilige Synthone, das heißt deren strukturanaologe Modifikationen, pro DNA-Kettenverlängerungsschritt in einem Mischungsverhältnis von 1:1:1:1 eingesetzt werden. Das hat zur Folge, daß je Position in einer DNA-Molekülkette alle vier Nucleoside mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingebaut werden. Eine DNA-Mischung mit DNA-Zufallssequenzen von jeweils beispielsweise 20 Nucleotiden Länge, dargestellt durch die Abfolge 5' (N)₂₀ 3', wobei N für Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxythymidin und Desoxycytidin steht, repräsentiert demnach eine Mischung aller einzelsträngiger DNA-Moleküle mit einer Kettenlänge von 20 Nucleotiden, das heißt 4^{20} verschiedene DNA-Moleküle. Die Anzahl von unterschiedlichen DNA-Zufallsequenzen pro erfindungsgemäßer DNA-Mischung beträgt demnach 4^x , wobei x die Kettenlänge oder Nucleotidanzahl der DNA-Zufallssequenz ist.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung betrifft die Erfindung ein vorgenanntes Verfahren, wobei die in der DNA-Mischung vorhandenen 4^x Zufallssequenzen in gleichen, vorzugsweise in im wesentlichen, molaren Mengenanteilen vorkommen. Die erfindungsgemäß eingesetzte DNA-Mischung ist also nicht im Hinblick auf eine konkrete Isolieraufgabe hin entwickelt, sondern stellt vielmehr eine für jede beliebige DNA- oder RNA-Isolieraufgabe einsetzbare DNA-Mischung ohne jegliche konkrete DNA- oder RNA-Spezifität dar. Die eingesetzte DNA-Mischung ist nur insoweit spezifisch, als daß sie Nucleinsäuren, das heißt DNA oder RNA, von anderen Stoffen wie zum Beispiel Proteinen, Zuckern oder ähnlichem trennen kann. Erfindungsgemäß kann jedoch vorgesehen sein, durch geeignete Auswahl der Binde-

beziehungsweise Hybridisierungsbedingungen zwischen zu isolierender Nucleinsäure und nucleinsäureaffinen Material oder der Lösebedingungen (Temperatur, Ionenstärke etc.) DNA von RNA zu unterscheiden. Das erfindungsgemäß Verfahren kann also in vorteilhafter Weise DNA- oder RNA-spezifisch durchgeführt werden.

Selbstverständlich kann die erfindungsgemäß einzusetzende DNA-Mischung aus Zufallssequenzen oder spezifischen Oligonucleotiden auch andere Nucleoside wie Desoxyinosin, Uridin, Pseudouridin, N²-Dimethyl-guanosin, N⁶-Isopentenyladenosin, also Synthone, enthalten. Erfindungsgemäß kann auch vorgesehen sein, anstelle der Desoxypentosen, Pentosen, also RNA-Bausteine, einzusetzen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer DNA-Mischung gegebenenfalls also auch eine RNA-Mischung verstanden.

Erfindungsgemäß können insbesondere Oligonucleotide als nucleinsäureaffines Material eingesetzt werden, wobei sowohl hochspezifische Sonden aber auch unspezifischere Oligonucleotide, wie fragmentierte Zielgenome oder Zufallsoligonucleotide, das heißt nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischungen, sogenannte Random-Oligonucleotide eingesetzt werden können. Die Verwendung von Random-Oligonucleotiden als nucleinsäureaffines Material bietet gegenüber Materialien wie Anionentauschern und Silica, die erfindungsgemäß auch eingesetzt werden können, den Vorteil einer geringeren Affinität gegenüber anderen Polyanionen als Nucleinsäuren und einer höheren Affinität zu den Nucleinsäuren aufgrund des Prinzip

- 20 -

der komplementären Basenpaarung im Vergleich zu Materialien wie Silica oder Anionenaustauschern, sie sind aber im Vergleich zu Oligonucleotiden mit spezifischen Sequenzen zur Reinigung verschiedener unterschiedlicher Nucleinsäuren geeignet. Die Kopp lung der Oligonucleotide an den Träger oder die Matrix erfolgt vorzugsweise über das 3'-Ende des Oligonucleotids, so daß bei einer gegebenenfalls erfolgenden Amplifikation, beispielsweise mittels PCR, keine Nebenprodukte entstehen können. Bei Verwendung spezifischer Oligonucleotide ist es erfindungsgemäß bevorzugt, Schmelztemperaturen unterhalb derer der PCR-Primer zu wählen, um Kompetitionen zu minimieren.

Neben der bevorzugten Verwendung von DNA-Oligonucleotiden ist der Einsatz von RNA-Oligonucleotiden und Peptide Nucleic Acids (PNAs) erfindungsgemäß möglich. Des weiteren ist es erfindungsgemäß bevorzugt, modifizierte Basen einzusetzen, um bestimmte Hybridisierungseffekte zu erzielen. Auch der Einsatz von speziellen Zuckern im Zusammenhang mit Nucleinsäureoligonucleotiden, wie beispielsweise in Beier et al., Science 283 (1999), 699 bis 703 beschrieben, ist erfindungsgemäß vorgesehen und insofern in den vorliegenden Offenba rungsgehalt mit einbezogen.

Die Erfindung weist den Vorteil auf, daß aus einer Probe bereits während des Probenaufschlusses in einem einzigen Schritt hochspezifisch Nucleinsäuren isoliert werden können und in reiner Form erhalten werden, so daß diese direkt für andere Analyse- oder Präparationsschritte, wie beispielsweise ein

PCR-Verfahren, eingesetzt werden können. Die erfundungsgemäße Vorgehensweise setzt in vorteilhafter Weise keine kosten- und zeitintensiven Anpassungsschritte des Verfahrens an die jeweilige Isolierungsaufgabe voraus. Vielmehr kann das erfundungsgemäße Verfahren direkt ohne weitere Modifikation für jede beliebige Isolierungsaufgabe eingesetzt werden.

In besonders bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, daß nach der Affinitätsbindung der in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material Verunreinigungen mittels geeigneter Pufferlösungen oder Wasser entfernt werden. Nach dem erfolgten Waschschnitt kann die affinitätsgebundene Nucleinsäure durch Erhöhung der Umgebungstemperatur, beispielsweise auf mindestens 70°C, zum Beispiel Siedetemperatur, in Gegenwart eines geeigneten Lösemittels, zum Beispiel einer Pufferlösung oder Wasser, von dem nucleinsäureaffinen Material abgelöst werden. Die Ablösung kann auch durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösepuffers oder eine Veränderung des pH-Wertes oder durch elektrisches Waschen erfolgen. Die erhaltene Nucleinsäure ist frei von Verunreinigungen und kann insbesondere durch PCR-Verfahren, auch in Gegenwart der gegebenenfalls immobilisierten DNA-Mischung, amplifiziert werden.

Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform eine Vorrichtung zur Isolierung und Prozessierung von Nucleinsäuren, insbesondere zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, wobei die Vorrichtung, im folgenden auch als Probenträger bezeichnet, mindestens eine Probenkammer mit minde-

stens zwei flächig ausgebildeten Elektroden und mindestens einem nichtleitenden Rahmenteil umfaßt, und wobei die mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden und das mindestens eine Rahmenteil als Wand-, Deckel- oder Bodenteil der Probenkammer ausgeführt sind. Die erfindungsgemäße Probenkammer weist also eine von Bodenteil, Wandteil oder Wandteilen sowie gegebenenfalls Deckelteil umschlossene im Querschnitt kreisförmige oder rechteckige Kammer auf, wobei Bereiche der Wand-, Boden- und/oder Dekkenteile als flächig ausgebildete Elektroden ausgeführt sind. Die erfindungsgemäß vorgesehenen vorzugsweise gegenüberliegend angeordneten mindestens zwei Elektroden weisen elektrische Anschlüsse auf und dienen der Erzeugung eines Probenaufschluß und gegebenenfalls Elektrohybridisierung, Elektrowaschen und Elektroelution sowie Elektrodetektion ermöglichen elektrischen Feldes konstanter Spannung oder gepulsten elektrischen Feldes. In bevorzugter Weise kann vorgesehen sein, daß das mindestens eine nichtleitende Rahmenteil mindestens eine Öffnung, zum Beispiel Eingabe- und Entnahmeeinheiten aufweist, die dem Einfüllen beziehungsweise der Entnahme von Probeflüssigkeit dient. Zudem kann vorgesehen sein, zwischen Bereichen des Rahmenteiles und/oder zwischen den Elektroden Meßeinheiten, zum Beispiel optische Meßeinheiten und deren gegebenenfalls vorhandene Anschlüsse zu lokalisieren, die den Nachweis gebundener Nucleinsäuren ermöglichen.

In bevorzugter Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, die Elektroden aus Aluminium, Edelstahl, Silber, Gold, Platin, Graphit oder ähnlichem

auszuführen, während in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die nichtleitenden Rahmenteile aus Kunststoff, Glas, Silicium oder ähnlichem ausgeführt sind.

Die Erfindung sieht also einen Probenträger vor, in dem das gesamte erfindungsgemäße einstufige Verfahren durchgeführt werden kann, das heißt der Probenaufschluß, die Nucleinsäureisolierung, die Nucleinsäurerereinigung und gegebenenfalls der Nucleinsäurenachweis. Als vorteilhaft erweist sich dabei, daß die Probeflüssigkeit nicht zwischen verschiedenen Behältern transferiert werden muß, sondern daß das Verfahren vielmehr in einem einzigen Behälter durchgeführt werden kann, der in der Lage ist, in seinem Innenvolumen ein elektrisches Feld zu erzeugen, welches dem Probenaufschluß und der Unterstützung der Nucleinsäurebindung an das nucleinsäureaffine Material dient. In besonders bevorzugter Weise ist der Probenträger im Mikrosystemtechnik in der Größe eines Chips ausgeführt, weist also Abmessungen von 1 bis 2 cm² auf. Das Rahmenteil kann demgemäß in solcher Ausführungsform auch flächig, das heißt eben ausgeführt sein, wobei keine Probenkammer vorgesehen ist und die Elektroden in das Rahmenteil integriert vorliegen. Auf diese Weise wird die Menge an Verbrauchsmaterial minimiert und der Probendurchsatz maximiert. Des weiteren bieten sich beispielsweise bei Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Chipgröße Vorteile bezüglich der anzulegenden Spannung, da hohe Feldstärken durch den geringen Elektrodenabstand bereits bei geringen Spannungen erreicht werden können. In vorteilhafter Weise ist die Geometrie des Probenträgers so zu

wählen, daß gegebenenfalls sowohl homogene als auch inhomogene elektrische Felder erzeugt werden können. In bevorzugter Ausführungsform ist ein solcher Chip nach den Prinzipien der Mikrofluidik aufgebaut.

In bevorzugter Weise ist die genannte erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, daß zumindest Teile des dem Innenvolumen zugewandten Bereichs der Elektroden und/oder des Rahmenteils immobilisiertes nucleinsäureaffines Material aufweisen. Demgemäß kann in erfindungsgemäß bevorzugter Weise ein Bereich der Elektroden beispielsweise mit spezifischen oder unspezifischen Oligonucleotiden gekoppelt sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, umfassend ein nucleinsäureaffines Material, zum Beispiel eine nur aus Zufallssequenzen bestehende, vorstehend beschriebene, DNA-Mischung, die an einer Matrix zum Beispiel einer Elektrode immobilisiert ist. Die Erfindung sieht also eine Vorrichtung, insbesondere eine Affinitätsmatrix, vor, mit Hilfe derer das vorgenannte Verfahren durchgeführt werden kann, insbesondere mit Hilfe derer Nucleinsäuren aus einer beliebigen Probe in einfacher und kostengünstiger Weise isoliert werden können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfaßt eine Matrix, die beispielsweise als Membran, als Kugelchen

(beads) oder Säulengel ausgeführt sein kann und als Träger oder Grundgerüst für die nur aus Zufallssequenzen bestehende DNA-Mischung fungiert. Es kann auch vorgesehen sein, magnetische Partikel, zum Beispiel Kügelchen, oder Elektroden, zum Beispiel aus Aluminium, Silber, Edelstahl, Gold, Platin und/oder Graphit als Matrix einzusetzen.

Die Erfindung sieht in vorteilhafter Weise vor, als Material für die Matrix ein chemisch und physikalisch weitgehend inertes Material einzusetzen, wie Glas oder Kunststoff, zum Beispiel Polystyrol oder Polypropylen oder ein entsprechend inertes Elektrodenmaterial.

Insbesondere ist das Material in bevorzugter Ausführungsform der Erfindung geeignet sein, Temperaturunterschiede in einem Intervall zwischen 10°C und 95°C, pH-Unterschiede in einem Intervall zwischen 0 bis 14 und Natrium- beziehungsweise Calciumchloridionenkonzentrationen in einem Intervall von 10 mM bis 2 M ohne signifikante Veränderung der Materialeigenschaften zu tolerieren. Darüber hinaus ist es bevorzugt, daß das eingesetzte Material unlöslich in Wasser Detergentien und Tensidmischungen ist sowie sich chemisch inert gegenüber chaotropen Reagenzien, wie zum Beispiel Isoguanidinthiocyanat, verhält.

Die Matrix ist in vorteilhafter Weise auf ihrer Oberfläche modifiziert, beispielsweise durch das Aufbringen von Biomolekülen, die hochaffin an der Oberfläche des Matrixmaterials binden. Ein derartiges auf der Matrix immobilisiertes Biomolekül kann

- 26 -

zum Beispiel Streptavidin sein. Die Matrixoberfläche kann jedoch auch derart modifiziert sein, daß eine kovalente Bindung zwischen dem nucleinsäureaffinen Material, zum Beispiel den Zufallssequenzen der DNA-Mischung, und der Matrix ermöglicht wird. Demgemäß kann die Matrix Aminogruppen aufweisen, die über einen Dialdehydspacer beziehungsweise ein Dialdehydverbindungs-molekül, zum Beispiel Glutardialdehyd, unter Bildung einer Schiff'schen Base mit einer zum Beispiel am 5'- oder 3'-Ende der DNA-Zufallssequenzen eingeführten Aminofunktion eine Bindung eingehen kann. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die Matrix vor Modifizierung ihrer Oberfläche zu reinigen, zum Beispiel mit Salpetersäure. Zudem sieht die Erfindung in vorteilhafter Ausführungsform vor, die Oberfläche der Matrix vor der Modifizierung zu silanisieren.

Die als nucleinsäureaffines Material eingesetzten Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung, zum Beispiel die Zufallssequenzen der DNA-Mischung, weisen demgemäß zum Zweck der Immobilisierung an der Matrix ebenfalls Modifikationen, am 3'- oder 5'-Ende, auf. Derartige Modifikationen können beispielsweise mit dem 5'-Ende der DNA-Zufallssequenz verbundene Biomoleküle wie Biotin sein, die hochaffin an auf der Matrix immobilisierte andere Biomoleküle binden, wie beispielsweise Streptavidin. Es kann auch vorgesehen sein, Aminofunktionen, Epoxidgruppen oder Succinimidester oder andere gängige funktionelle Gruppen in die als nucleinsäureaffines Material verwendeten Nucleinsäuren einzuführen vorzugsweise am 5'- oder 3'-Ende, so daß diese unter Bildung einer Schiff'schen Base mit an der Matrix im-

mobilisierten Aldehydgruppen kovalent binden können.

In jedem Fall werden die modifizierten Nucleinsäuren, zum Beispiel die DNA-Zufallssequenzen in Einzelstrangform und die modifizierten Matrix miteinander in Kontakt gebracht, so daß die Nucleinsäuren an der Matrix immobilisiert werden. Die mit dem erfindungsgemäß einzusetzenden nucleinsäureaffinen Material in Form von Nucleinsäuren beladene Matrix wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch als Affinitätsmatrix bezeichnet.

Die erfindungsgemäße Affinitätsmatrix kann in vorteilhafter Weise auch auf der Oberfläche von Partikeln aufgebracht werden, die im Rahmen eines Aufschlusses dem Aufschluß zu- beziehungsweise ausgesetzt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer nur aus Zufallssequenzen bestehenden DNA-Mischung, insbesondere einer gleichteiligen Mischung, aus 4^x verschiedenen DNA-Zufallssequenzen, wobei x gleich der Kettenlänge der DNA-Zufallssequenz ist, vorzugsweise 5 bis 50, insbesondere 15 bis 30, zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehöriger Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 eine Matrix einer erfindungsgemäßen Vorrichtung,

Figur 2 eine erfindungsgemäße Vorrichtung beziehungsweise DNA-Affinitätsmatrix,

Figur 3 ein Elektropherogramm,

Figur 4 zwei Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA an unbehandelte und behandelte Glasperlen,

Figur 5 eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in Form eines Probenträgers und

Figur 6 eine weitere Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung ausgeführt als Chip.

Beispiel 1: Vorrichtung zur DNA-Isolierung

Die Figur 1 zeigt eine Matrix 10, die in Form einer Membran 1 ausgeführt ist. Die Membran 1 ist auf ihrer Oberfläche mit Streptavidinmolekülen 3 beschichtet.

Die Figur 2 stellt eine Affinitätsmatrix 100 dar, die hergestellt wurde, indem die Matrix 10 mit 5' modifizierten chemisch oder synthetisch hergestellten DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' einer DNA-Mischung in Einzelstrangform in Kontakt gebracht wurde, wobei die 5'-Modifikation der DNA-Zufallsse-

quenz diese in die Lage versetzt, hochaffin an die Streptavidinmoleküle 3 zu binden. Die Figur 2 stellt dar, daß die 5'-Enden der DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' jeweils an Biotin 5 gebunden sind. Die Biotinmodifikation am 5'-Ende der DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' bindet hochaffin an die immobilisierten Streptavidinmoleküle 3, so daß eine auf einer Matrix 10 immobilisierte DNA-Mischung mit den einzelnen DNA-Zufallssequenzen 7, 7', 7'' gebildet wird.

Beispiel 2: Isolierung von DNA aus einem Zellaufschluß

A) Herstellung der Affinitätsmatrix

Für die Versuche wurden Ballotini Micro-Glaskugeln Typ 3000 der Firma Potters-Ballotini GmbH, Kirchheimbolanden verwendet. Ihre Größe war mit bis zu 50 µm angegeben. Um das Ausgangsmaterial zu reinigen und die Oberfläche für die Silanisierung vorzubereiten, wurden die Glaskügelchen in Salpetersäure gekocht. 50 g der Glaskügelchen wurden in einen 1 l-Dreihalskolben mit Rücklaufkühler zu 500 ml circa 7%iger Salpetersäure gegeben. Über einen Heizpilz wurde bis zum Sieden erhitzt und 1 Stunde unter Rückfluß gekocht. Währenddessen wurde über einen Magnetrührer mit Rührfisch gerührt. Nach dem Erkalten wurde die überstehende Flüssigkeit abdekantert. Die Glaskügelchen wurden dreimal mit Wasser in MilliQ-Qualität gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert. Bei 95°C wurden sie über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Da nach dem Trocknen mit

- 30 -

bloßem Auge noch Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde der gesamte Reinigungsvorgang nochmals wiederholt.

10 g der trockenen und gereinigten Glaskügelchen wurden zu 200 ml trockenem Methanol in einen 250 ml Einhals-Rundkolben gegeben. Der Kolben wurde mit Argon gespült. Es wurden 20 ml 3-Aminopropyltrimethoxysilan (Fluka) zugegeben. Als Katalysator wurden 0,5 ml Triethylamin zugesetzt. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde abdekantiert und die Glaskügelchen mit Wasser (MilliQ) gewaschen und über eine Nutsche abfiltriert.

Zunächst wurde aus 160 ml 0,1 M K_2HPO_4 und 40 ml 0,1 M KH_2PO_4 ein Kaliumphosphatpuffer hergestellt und auf pH 7,5 eingestellt. Aus 10 ml 25%iger Glutardialdehyd-Lösung und 90 ml des Kaliumphosphatpuffers wurde eine 2,5%ige Glutardialdehyd-Lösung hergestellt. Zu 40 ml der 2,5%igen Glutardialdehyd-Lösung wurden 4 g der silanisierten Glaskügelchen zugegeben und circa 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Glaskügelchen wurden anschließend mit Wasser, Kaliumphosphatpuffer und wieder gut mit Wasser gewaschen.

Oligonucleotide (1 μ mol pro Ansatz) (15-mere, jedes 15-mer in gleicher Konzentration, das heißt, es liegt eine Verteilung sämtlicher theoretisch möglicher Oligomere mit den Nucleotiden A,T,G und C in jeweils gleichen Anteilen vor, Firma Interactiva, Ulm, Deutschland) wurden in 1 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. In einem 15 ml Röhrchen (Greiner

GmbH) wurde zu 4 ml Kaliumphosphatpuffer 1 g der silanisierten und mit Glutardialdehyd aktivierten Glaskügelchen sowie 1 ml der Primer-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde kurz in Eis gekühlt. Über Nacht wurde das Röhrchen im Kühlraum auf einen Roller gelegt und dort 17 Stunden gerollt. Die Glaskügelchen wurden in einer Minifuge (Heraeus) 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und zunächst im Kühlschrank aufbewahrt. Das Pellet wurde dreimal in circa 6 ml Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und abzentrifugiert, um ungebundene Primer auszuwaschen. Die Kügelchen wurden mit Wasser (MilliQ) aufgeschlemmt und je zur Hälfte in zwei Eppendorfhüttchen gegeben. Die eine Hälfte wurde so eingefroren, die andere Hälfte wurde in 3 Durchgängen zu je 10 Minuten in der Speedvac getrocknet und ebenfalls im Gefrierschrank gelagert. Um abschätzen zu können, ob tatsächlich Primer gebunden wurden, wurden von der Primer-Stammlösung und vom Überstand nach dem Anfügen UV-Spektren bei 260 nm aufgenommen. Aus den Spektren wurde die jeweilige Primer-Konzentration ermittelt.

B) Zellaufschluß und DNA-Isolierung

In einem Reaktionsgefäß wurden 300 µl einer physiologisch gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,4; 3 mM EDTA) mit 10^9 KBE/ml an Escherichia coli mit 100000 elektrischen Impulsen einer Feldstärke von 1,5 kV/cm behandelt. Die Zeitkonstante betrug 2 µs (exponentiell abfallende Impulsform). Die Impulsfrequenz betrug 5 Hz. Anschließend wurden 50 bis 500 mg der Oligonucleotid-beschichteten Affinitätsperlen zugegeben. Das Reaktionsgemisch erwärmt

sich dabei, was ausreichte, die freigesetzte doppelsträngige DNA zu denaturieren, so daß sie beim Abkühlen der Reaktionsmischung durch Hybridisierung an die Affinitätsmatrix zu binden vermochte. Durch Unterschichten des Reaktionsgemisches mit Chloroform wurde eine Phasentrennung herbeigeführt, wobei sich die Glasperlen, aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes in der Chloroformphase anreicher-ten. Der wäßrige Überstand, der neben Zelltrümmern alle wasserlöslichen Bestandteile des Zellauf-schlusses enthält, wurde abgenommen und die Glas-perlen, denen die zu isolierende DNA anhaftete, im Vakuum getrocknet.

Wurde die Isolierung der DNA an Dynabeads durchge-führt, wurden 50 µl Zellysat mit 50 µl konjugierten Dynabeads der Konzentration 5 mg/ml in einem Puffer der Zusammensetzung 20 mM Tris/HCl pH = 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA, versetzt. Das resultierende Ge-misch inkubierte hier für 10 Minuten auf einem Rol-ler und für weitere 10 Minuten im Stehen. Die mit DNA beladenen Partikel wurden magnetisch separiert und zweimal mit je 100 µl Waschpuffer nach Herstel-lerangaben gewaschen.

C) Elution von DNA von der Affinitätsmatrix

Die DNA enthaltenden Affinitätsmatrices wurden wahlweise in Wasser oder einem Puffer der Zusam-men-setzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, ph = 8,0 aufgewärmt. Die resultierende Suspension wurde 10 Minuten zum Sieden erhitzt, wobei sich die an die Affinitätsma-trix gebundene DNA löste und mit dem Überstand, in der Hitze, abgenommen werden konnte.

Beispiel 3: DNA-Isolierung und PCR

In einem ersten Experiment wurde die prinzipielle Durchführbarkeit der Isolierung von DNA an immobilisierten DNA-Zufallssequenzen (15-mere, wie in Beispiel 2) gezeigt. Dazu wurden am 5'-Ende biotinylierte DNA-Zufallssequenzen an kommerziell erhältliche Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel immobilisiert und ihre DNA-Bindungseigenschaften mit den Bindungseigenschaften eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungssystems (DYNAL Direct) verglichen. Als Referenz-DNA diente ein das MIF-Gen enthaltendes Plasmid, das aus intakten Escherichia coli Zellen durch chemischen Zellaufschluß freigesetzt wird. Nach der Plasmid-Isolierung wurde das MIF-Gen mit einem geeigneten Sondenpaar amplifiziert und die PCR-Produkte elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse dieser Vergleichsuntersuchungen sind in Figur 3 dargestellt. Die Bahnen 3 und 4 des Elektropherogramms repräsentieren das MIF-PCR-Produkt von Plasmid-DNA, die an DNA-Zufallssequenzen isoliert werden konnte. Dem sind in den Bahnen 5 und 6 die MIF-PCR-Produkte der mit Hilfe des kommerziellen Systems isolierten Plasmid-DNA gegenübergestellt. Es zeigt sich weder ein qualitativer, noch ein quantitativer Unterschied zwischen beiden Isolierungsstrategien.

Beispiel 4: Affinitätschromatographie

Die als Affinitätsmatrix zur DNA-Isolierung hergestellten Glasperlen nach Beispiel 2 wurden in eine HPLC-Leersäule übergeführt und dort auf ihre DNA-Bindungskapazität untersucht. Ein wesentlicher Vorteil säulenchromatographischer Verfahren gegenüber sogenannten Batch-Verfahren ist ihre hohe Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, die Versuchsbedingungen (Flußrate, Laufmittel, Temperatur) auf einfache Weise variieren zu können. Die Figur 4 stellt Chromatogramme der Bindung von Standard-DNA (jeweils 25 µg) bei 50°C und einem Puffer der Zusammensetzung 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 8,0 an unbehandelte Glasperlen und an Glasperlen mit immobilisierten DNA-Zufallssequenzen dar. Die Differenz der Flächen unter den Kurven (Kurve 1: Glasperlen ohne DNA-Zufallssequenz; Kurve 2: Glasperlen mit DNA-Zufallssequenz) entspricht der DNA-Bindungskapazität der Affinitätsmatrix. Die Flußrate betrug jeweils 0,1 ml/min. Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich (vgl. Figur 4), daß die DNA-Bindungskapazität der mit Zufallssequenzen beschichteten Glasperlen die Bindungskapazität unbeschichteter Glasperlen um das 7,16 fache übertraf.

Beispiel 5: Nucleinsäureisolierung unter Einsatz elektrischer Felder mittels eines Probenträgers in Chipformat

Die Figur 5 zeigt eine Vorrichtung 200, umfassend eine Probenkammer 210 aus vier zu zwei gegenüber-

liegenden Elektrodenpaaren zusammengefaßte Elektroden 220, 220' und einem Rahmenteil 230 aus nicht leitenden Materialien. Der Probenträger ist im Querschnitt rechteckig und im Chipformat aufgebaut, das heißt weist eine Größe von 1 bis 2 cm² auf. Nicht dargestellt ist der Deckel- und Bodenteil der Probenkammer 210. Rahmenteil 230 und die vier flächig ausgebildeten Elektroden 220, 220' bilden die Wände und umschließen ein Innenvolumen das der Aufnahme der Probe dient. Es kann vorgesehen sein, einen Abstand der beiden gegenüberliegend angeordneten und jeweils eine Wand bildenden Elektrodenpaare 220, 220' von 100 nm bis 5 mm und einen Elektroden-durchmesser bis 1 cm auszuführen. Dargestellt ist, daß nicht leitende Bereiche 240 die einzelnen Elektroden 220, 220' der jeweiligen Elektrodenpaare mit ihren Anschlüssen 225 voneinander trennen, so daß inhomogene und annähernd homogene elektrische Felder erzeugt werden können. So kann die Bildung von inhomogenen Feldern durch Anlegen einer Spannung an nur zwei oder drei von vier leitenden Elementen 220, 220' erreicht werden. Vorzugsweise werden die nicht leitenden Bereiche 240 zwischen den leitenden Elementen 220, 220' eines Elektrodenpaars möglichst klein gewählt, so daß annähernd homogene elektrische Felder entstehen können, wenn zum Beispiel die leitenden Elemente, also Elektroden, 220' als Kathode und die leitenden Elemente, also Elektroden, 220 als Anode fungieren. Die Probenkammer 210 weist ein Rahmenteil 230 auf, welches mit Filtern versehene Eingabe- 260 und Entnahmeeinheiten 270 aufweist. Die Eingabe- und Entnahmeeinheiten 260, 270 sind in anschlußartige nicht leitende Elemente 280 des Rahmenteils 230 so eingepaßt, daß der

Probenträger 200 gefüllt und entleert werden kann. Um gegebenenfalls spektrophotometrische oder luminometrische Messungen durchführen zu können, weist die Vorrichtung 200 optische Einheiten 290 zwischen nicht leitenden Bereichen 295 und 280 des Rahmen-teils 230 auf, so daß die optischen Einheiten so angepaßt werden können, daß Anschlüsse entstehen. Zur elektrischen Detektion können die Anschlüsse 225 der Elektroden 220, 220' verwendet werden. Dargestellt ist auch, daß an den Elektroden 220 Zufallssequenzen 300 der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung immobilisiert sind. Es kann auch vorgesehen sein, die Zufallssequenzen 300 zusätzlich oder ausschließlich am nicht leitenden Element 240 im Bereich der Elektroden 220, 220' anzubringen. Um sämtliche Verfahrensschritte unter Einsatz elektrischer Felder, das heißt Probenaufschluß, Nucleinsäureaufreinigung und gegebenenfalls Nucleinsäure-Waschen sowie -detektion mit dem Probenträger 200 durchführen zu können, müssen ein oder mehrere entsprechende spannungsgebende Apparaturen an den Probenträger 200 angeschlossen werden, um so die verschiedenen notwendigen Felder erzeugen zu können. Die erfindungsgemäße Vorrichtung zeichnet sich also insbesondere dadurch aus, daß Teile oder Bereiche der Probenkammer 210, also der Wand, des Boden- und/oder Deckelteils aus Elektroden aufgebaut sind, die mindestens ein elektrisches Feld in der Kammer erzeugen können, wobei in Wänden, Boden oder Deckel Öffnungen zur Probeentnahme, -eingabe und/oder Detektion vorhanden sein können.

Die erfindungsgemäße Verfahrensweise sieht unter Einsatz der vorgenannten Vorrichtung zunächst vor,

daß eine Probe, wie in Wasser befindliche E. coli-Zellen, in den Probenträger 200 eingebracht wird. Anschließend kann gegebenenfalls eine Dielektrophorese unter Einsatz eines elektrischen Feldes zur Konzentrierung beziehungsweise Abtrennung bestimmter biologischer Zellen oder als Voraussetzung für eine Elektrofusion vorgesehen sein, wobei an die Anschlüsse 225 der Elektroden 220, 220' eine entsprechende Spannung angelegt wird. Dabei kann eine Elektrofusion vorgesehen sein, um die Elektrolyse zu unterstützen oder eine Markierung durchzuführen. Anschließend wird eine elektrische Spannung beispielsweise zur Erzeugung gepulster elektrischer Felder oder eines elektrischen Feldes konstanter Spannung so angelegt, daß eine Elektrolyse der biologischen Zellen oder der Viren erfolgt, wobei gegebenenfalls die Bedingungen so eingestellt werden können, daß nur bestimmte biologische Zellen elektrolysiert werden. Vorliegend wird ein elektrisches Feld mit einer Feldstärke von 0,5 bis 50 kV/cm. Anschließend werden die Bedingungen so gewählt, daß die aus den aufgeschlossenen Zellen freigesetzten Nucleinsäuren unter Einsatz eines elektrischen Feldes mit entweder frei in der Probenkammer vorliegenden Zufallssequenzen der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung oder mit den im Anodenbereich an leitenden und/oder nicht leitenden Bereichen der Probenkammer 210 immobilisierten Zufallssequenzen 300 der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Mischung elektrohybridisieren können. Für den Zellaufschluß und die Elektrohybridisierung wurden Impulszahlen von 1000 bis 10000, Impulsdauer beziehungsweise Zeitkonstanten von 2 µs bis 50 ms und Feldstärken von 0,5 bis 20 kV/cm eingesetzt.

Anschließend kann gegebenenfalls elektrostringentes Waschen unter Umpolung und An- beziehungsweise Entreicherung bestimmter Nucleinsäuren und Abtrennung unerwünschter Stoffe, zum Beispiel von Amplifikationsinhibitoren, durchgeführt werden. In der Probenkammer 210 schließt sich anschließend gegebenenfalls eine Elektroelution und gegebenenfalls eine Amplifikation der noch vorhandenen Nucleinsäuren an, vorzugsweise über eine elektrische, isotherme PCR, wie beschrieben in WO 97/47767. Schließlich kann, vorzugsweise elektrisch, eine Detektion der gebundenen oder frei vorliegenden aufgereinigten Nucleinsäuren erfolgen (beschrieben zum Beispiel in Hintsche, 1999, a.a.O.)

Dem Fachmann ist klar, daß zwischen oder nach einzelnen beschriebenen Schritten je nach Isolierstrategie ein Waschen oder Eluieren erwünschter oder gegebenenfalls nicht erwünschter Substanzen oder Nucleinsäuren ebenso wie eine Änderung des elektrischen Feldes hinsichtlich Polung, Feldstärke, Impulszahl, Impulsdauer oder Impulsfrequenz erfolgen kann.

Beispiel 6:

Die Figur 6 zeigt eine erfindungsgemäße Vorrichtung 400 zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die Vorrichtung 400 aus einem flächig ausgebildeten nichtleitenden Rahmenteil 560 und mindestens zwei in dieses flächig ausgebildete Rahmenteil integrierten Elektroden 500 aufgebaut

ist. Die erfindungsgemäße Vorrichtung 400 ist als Chip ausgeführt, das heißt weist keine aus Wand- oder Deckelteil gebildete Probenkammer auf. Die Erfindung betrifft also auch einen flächig ausgebildeten Probenträger, das heißt einen Chip, aus einer nichtleitenden Chipbasis 560, auch als Rahmenteil bezeichnet, und zwei in diese Chipbasis 560 integrierten flächigen Elektroden 500. In bevorzugter Weise können an den Elektroden 500 nucleinsäureaffine Materialien 550, wie beispielsweise eine DNAMischung aus Zufallssequenzen, immobilisiert sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich durch eine gezielte Ansteuerung der Elektroden in chronologischer Abfolge durchführen, beispielsweise eine Elektrodenansteuerung 1 zum elektrischen Aufschluß des biotischen beziehungsweise abiotischen Materials (Nucleinsäureisolierung), eine Elektrodenansteuerung 2 zur elektrischen Nucleinsäurereinigung, eine Elektrodenansteuerung 3 zur elektrischen isothermen Nucleinsäureamplifikation und eine Elektrodenansteuerung 4 zur elektrischen Detektion.

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, wobei die Probe unter dem Einfluß wenigstens eines elektrischen Feldes aufgeschlossen wird und die freigesetzten Nucleinsäuren mit einem nucleinsäureaffinen Material so in Kontakt gebracht werden, daß eine Bindung zwischen den freigesetzten Nucleinsäuren und dem nucleinsäureaffinen Material stattfinden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei im Anschluß an das Inkontaktbringen der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material die restliche Probe von den an dem nucleinsäureaffinen Material gebundenen Nucleinsäuren abgetrennt wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld ein gepulstes elektrisches Feld ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das elektrische Feld ein Feld einer konstanten Spannung ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei elektrische Felder eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während des Inkontaktbringens der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material wenigstens ein elektrisches Feld eingesetzt wird, vorzugsweise ein gepulstes elektrisches Feld oder ein elektrisches Feld konstanter Spannung.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld während des Inkontaktbringens der Nucleinsäuren mit dem nucleinsäureaffinen Material umgepolt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die gebundenen Nucleinsäuren gewaschen werden, vorzugsweise unter Einsatz eines elektrischen Feldes.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Anschluß an die Bindung der Nucleinsäuren an das nucleinsäureaffine Material oder ein gegebenenfalls erfolgtes Ablösen der gebundenen Nucleinsäure von dem nucleinsäureaffinen Material die Nucleinsäuren optisch, luminometrisch, spektralphotometrisch, radioaktiv oder elektrisch unter Einsatz eines elektrischen Feldes nachgewiesen werden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nucleinsäuren vor dem Nachweis amplifiziert werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material frei in Lösung vorliegt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das nucleinsäureaffine Material an einem Probenträger immobilisiert vorliegt.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material ein Anionentauscher, Silica, Diatomeen, ein nucleinsäurebindendes Protein oder eine Nucleinsäure ist.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das nucleinsäureaffine Material ein fragmentiertes Zielgenom, ein Gemisch von Zufallsnucleinsäuresequenzen oder eine sequenzspezifische Nucleinsäuresequenz ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Nucleinsäuresequenz ein Oligonucleotid ist.

16. Vorrichtung zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, insbesondere zur Durchführung eines der vorgenannten Verfahren, umfassend mindestens eine Probenkammer (210) mit mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden (220,220') und mindestens einem nicht-leitenden Rahmenteil (230), wobei die mindestens zwei flächig ausgebildeten Elektroden (220,220') und das Rahmenteil (230) als Wand-, Deckel- oder Bodenteil der Probenkammer (210) ausgeführt sind.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, wobei die Elektroden (220,220') aus Aluminium, Edelstahl, Silber, Gold, Platin oder Graphit bestehen oder dieses einzeln oder in Kombination enthält.

- 43 -

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 oder 17, wobei das nicht-leitende Rahmenteil (230) aus Kunststoff, Glas oder Silicium besteht oder diese einzeln oder in Kombination enthält.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei in das mindestens eine Rahmenteil (230) Eingabe- und Entnahmeeinheiten (260,270) integriert sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei in das Rahmenteil (230) optische Einheiten (290) integriert sind.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei das nucleinsäureaffine Material an mindestens einer Elektrode (220,220') und/oder dem mindestens einen Rahmenteil (230) immobilisiert ist.
22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei das nucleinsäureaffine Material Silica, Anionentauscher oder eine Nucleinsäure (300) ist, insbesondere ein fragmentiertes Zielgenom, Zufallssequenzen oder eine sequenzspezifische Nucleinsäuresequenz.
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei die Vorrichtung Chipformat von 1 bis 2 cm² aufweist.
24. Vorrichtung zur Durchführung eines vorgenannten Verfahrens, umfassend ein flächig ausgebildetes nichtleitendes Rahmenteil (560), mindestens zwei in

dem Rahmenteil (560) integrierte flächig ausgebildete Elektroden (500) sowie auf dem Rahmenteil (560) und/oder den Elektroden (500) immobilisiertes nucleinsäureaffines Material (550).

1/3

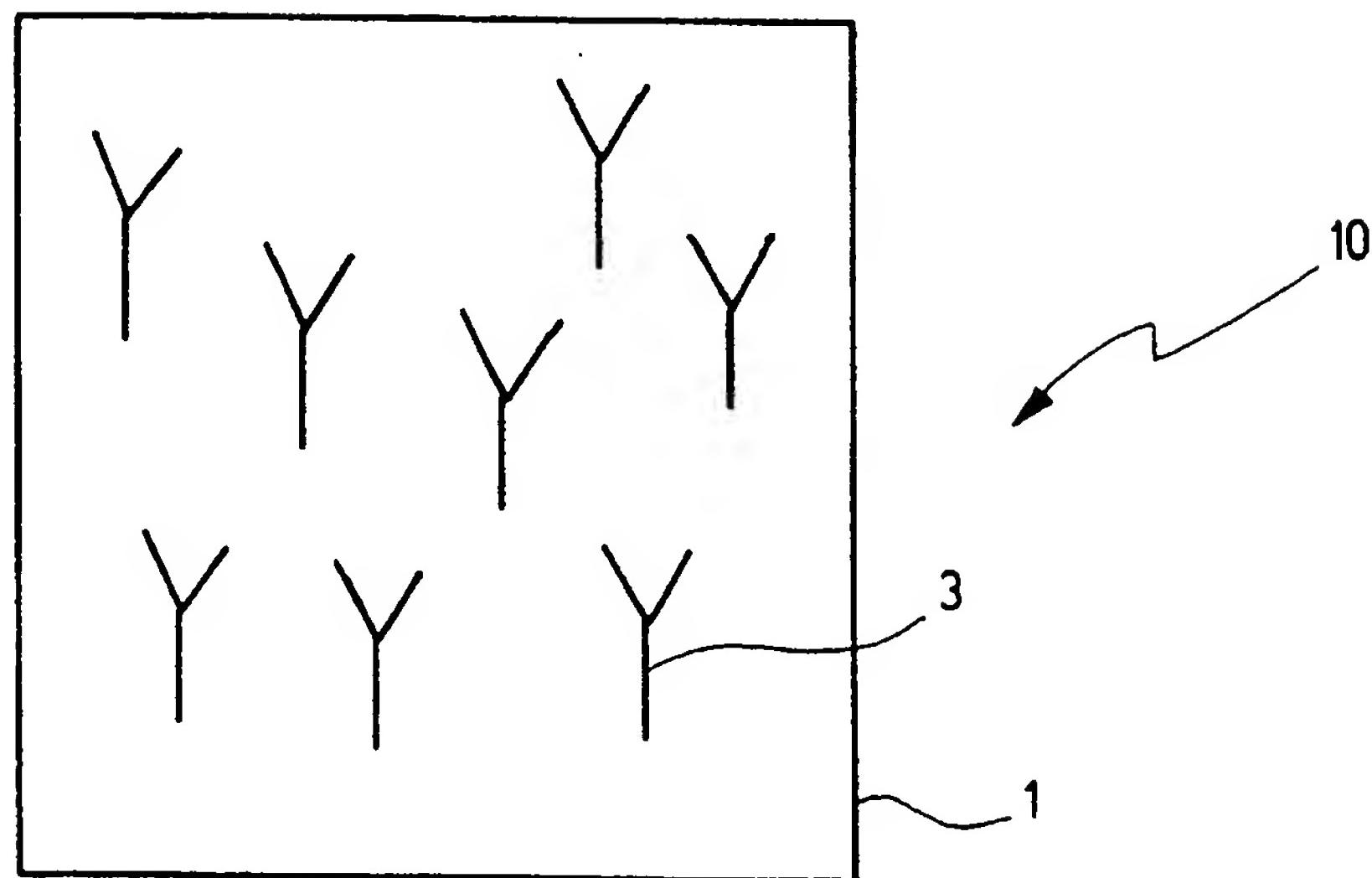


Fig. 1

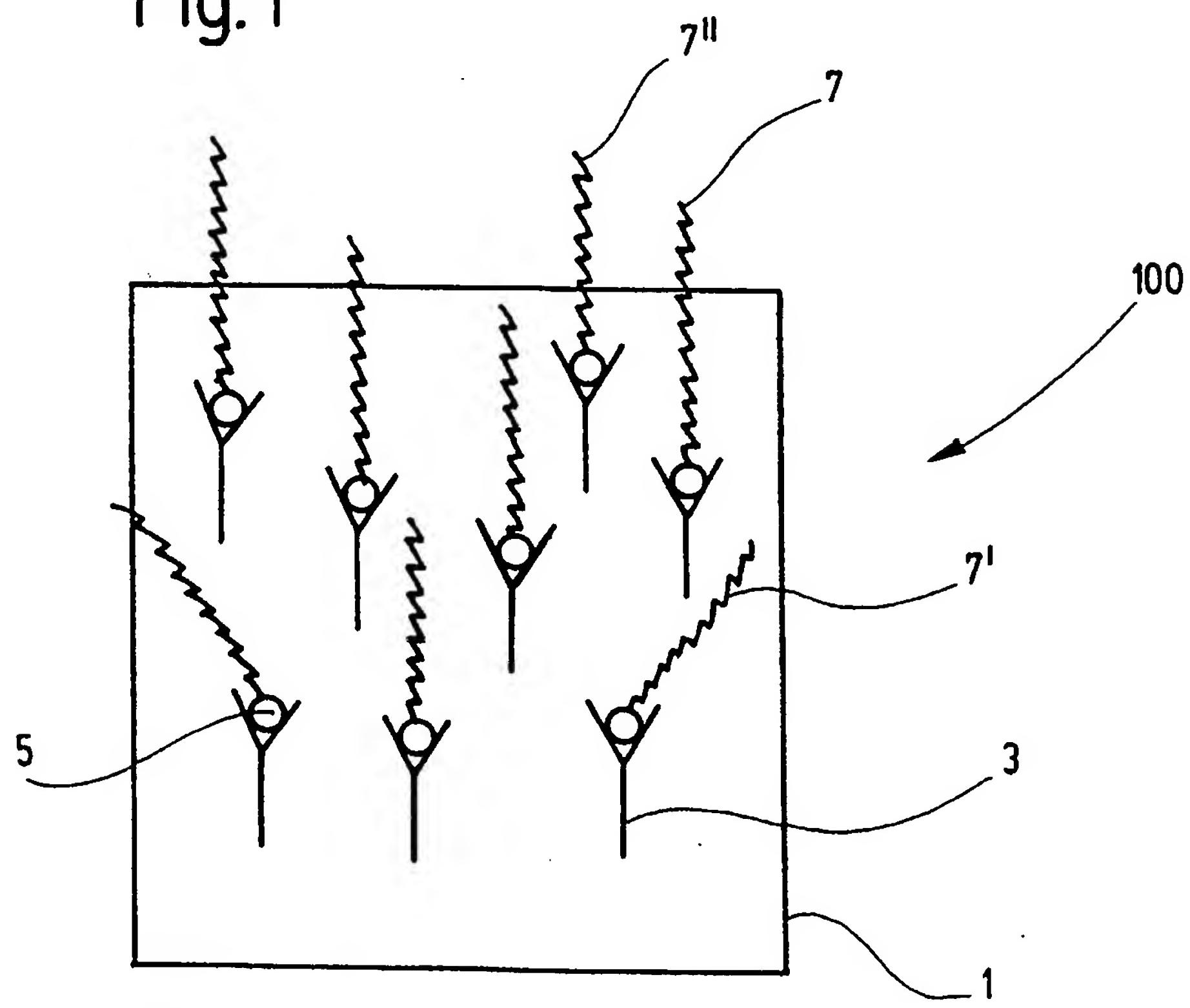


Fig. 2

2/3



Fig. 3

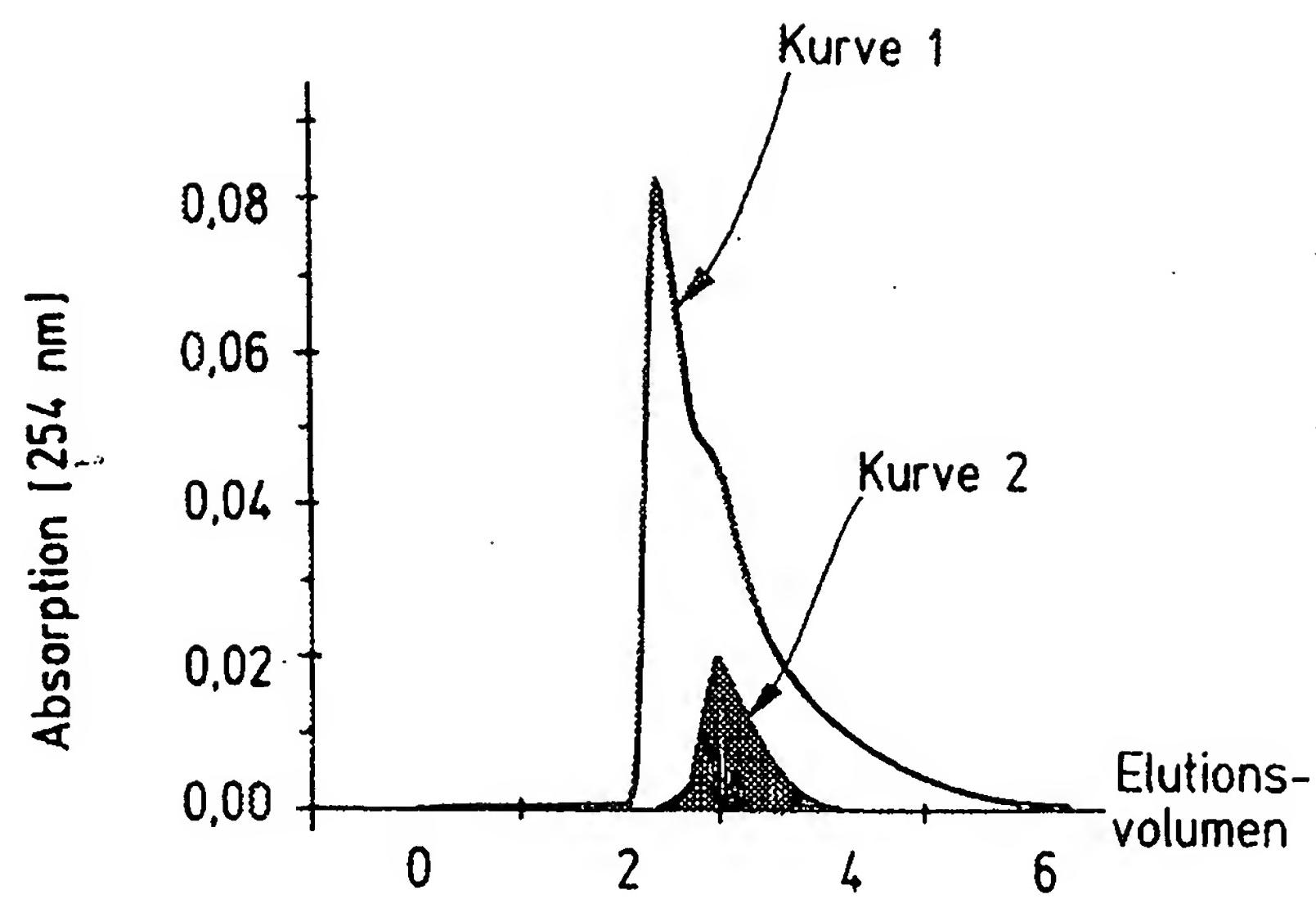


Fig. 4

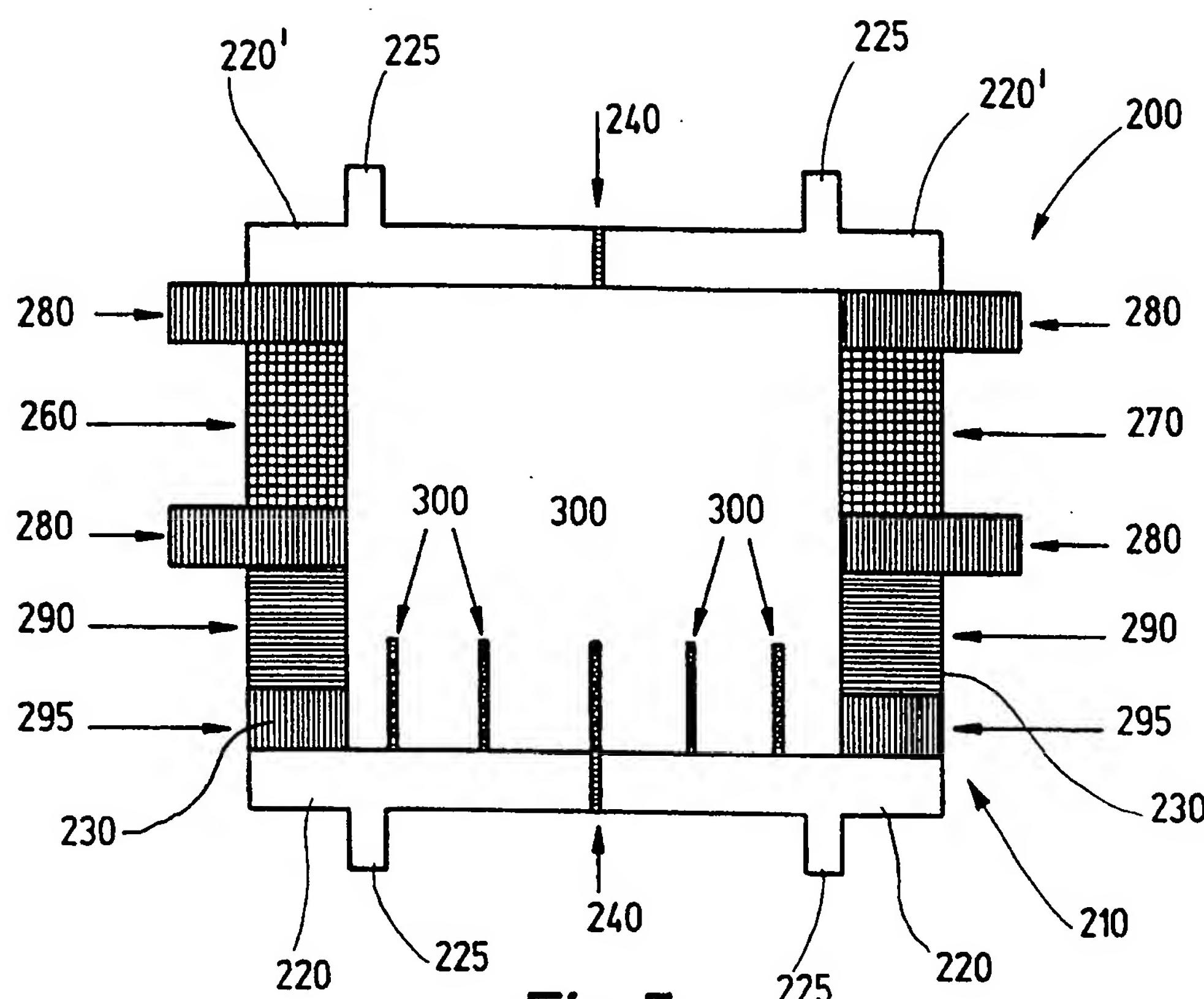


Fig. 5

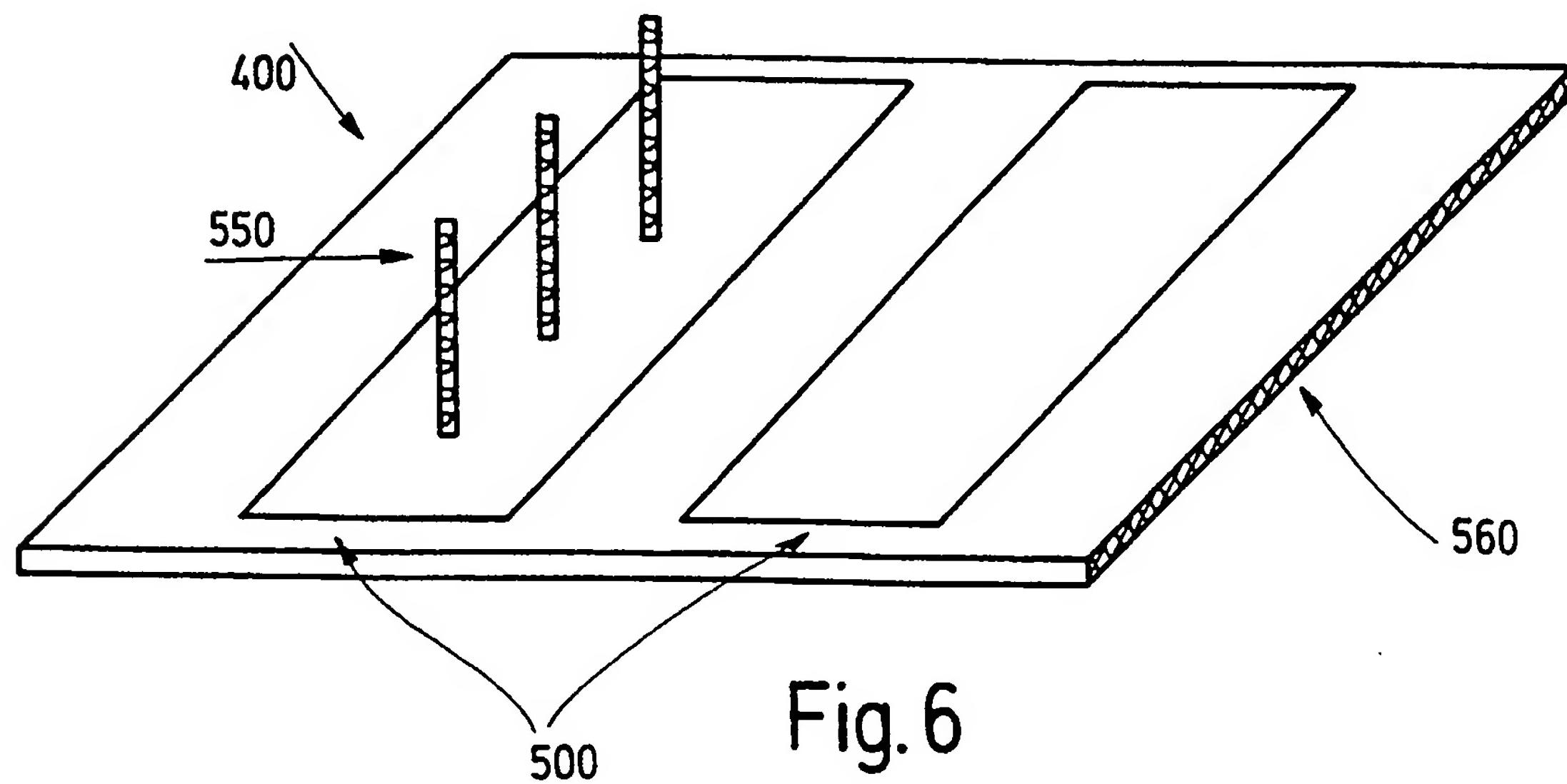


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/EP 99/03047

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 C12N15/10 G01N1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 297 02 254 U (BERTLING WOLF PROF DR) 3 July 1997 (1997-07-03) see the whole document particularly claims ---	1-24
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 (1997-07-31) see claims ---	1-24
A	EP 0 301 899 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 1 February 1989 (1989-02-01) the whole document ---	
A	WO 93 22678 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ; HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 11 November 1993 (1993-11-11) see claims and figures ---	
		-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

24 August 1999

30/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03047

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INT INC) 9 October 1986 (1986-10-09) see particularly claims (z.B. 10) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 29702254 U	03-07-1997	DE	19628171 A	15-01-1998
		AU	3537697 A	09-02-1998
		WO	9802399 A	22-01-1998
		EP	0912470 A	06-05-1999

WO 9727317 A	31-07-1997	AU	2253397 A	20-08-1997
		EP	0880598 A	02-12-1998

EP 0301899 A	01-02-1989	CA	1297432 A	17-03-1992
		JP	1125395 A	17-05-1989
		US	4921805 A	01-05-1990

WO 9322678 A	11-11-1993	US	5846708 A	08-12-1998
		EP	0638173 A	15-02-1995
		JP	7508831 T	28-09-1995
		US	5653939 A	05-08-1997

WO 8605815 A	09-10-1986	AU	5667186 A	23-10-1986
		EP	0216844 A	08-04-1987

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68 C12N15/10 G01N1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 297 02 254 U (BERTLING WOLF PROF DR) 3. Juli 1997 (1997-07-03) siehe ganzes Dokument besonders Ansprüche ---	1-24
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31. Juli 1997 (1997-07-31) siehe Ansprüche ---	1-24
A	EP 0 301 899 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 1. Februar 1989 (1989-02-01) das ganze Dokument ---	
A	WO 93 22678 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE ; HOUSTON ADVANCED RES CENTER (US); MASSACH) 11. November 1993 (1993-11-11) siehe Ansprüche und Abbildungen ---	
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24. August 1999

30/08/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INT INC) 9. Oktober 1986 (1986-10-09) siehe besonders Ansprüche (z.B. 10) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03047

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 29702254 U	03-07-1997	DE	19628171 A	15-01-1998
		AU	3537697 A	09-02-1998
		WO	9802399 A	22-01-1998
		EP	0912470 A	06-05-1999

WO 9727317 A	31-07-1997	AU	2253397 A	20-08-1997
		EP	0880598 A	02-12-1998

EP 0301899 A	01-02-1989	CA	1297432 A	17-03-1992
		JP	1125395 A	17-05-1989
		US	4921805 A	01-05-1990

WO 9322678 A	11-11-1993	US	5846708 A	08-12-1998
		EP	0638173 A	15-02-1995
		JP	7508831 T	28-09-1995
		US	5653939 A	05-08-1997

WO 8605815 A	09-10-1986	AU	5667186 A	23-10-1986
		EP	0216844 A	08-04-1987

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.